

Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas

**Desarrollo de herramientas bioquímicas
para el estudio de tubulina acetilada y su
aplicación para el análisis del complejo
tubulina acetilada-PMCA**

Por Lic. en bioquímica clínica Agustín Carbajal

CIQUIBIC - CONICET
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

TML

14/09/20

Attd

13823

C

574.19245

R-T

ROYAL MAIL

A mi familia y amigos

Director de tesis

Dr. Carlos A. Arce



Comisión de tesis

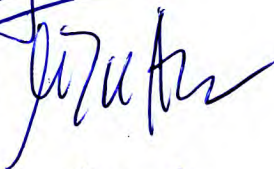
Dra. Marta E. Hallak



Dra. Mabel Yudi



Dra. Cecilia I. Álvarez



Evaluador externo

Dr. Luis A. López



BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUIMICAS

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo de las siguientes instituciones:

- Agencia Nacional de Promoción de Ciencia y Tecnología (FONCyT)
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET)
- Secretaría de Ciencia y Técnica (SeCyT)
- Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba
- Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MinCyT)

INDICE

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	11
CITOESQUELETO.....	12
Filamentos intermedios.....	12
Filamentos de septinas.....	13
Microfilamentos.....	14
MICROTÚBULOS.....	15
Estructura, función y características generales.....	15
Organización de los microtúbulos en la célula.....	17
Proteínas que interaccionan con microtúbulos.....	19
Isoformas de tubulina.....	22
Isoformas genéticas.....	22
Modificaciones postraduccionales de tubulina.....	22
Poliglutamilación.....	23
Poliglicinación.....	24
Detirosinación.....	24
Modificación $\Delta 2$	25
Acetilación.....	25
Enzimas involucradas en la acetilación de tubulina.....	26
Acetiltransferasas: α -TAT1 y otras.....	26
Deacetilasas: HDAC6 y otras.....	28
Rol fisiológico de la acetilación de tubulina.....	34
Purificación de tubulina.....	39
PMCA.....	40
OBJETIVOS.....	42
RESULTADOS.....	44
<u>Capítulo I: Desarrollo de un método de purificación</u> de tubulina enriquecida en el isotipo acetilado.....	45
Identificación de la enzima deacetilante de tubulina.....	46
Efecto del TSA sobre la polimerización y depolimerización de tubulina.....	47
Protocolo para la purificación de tubulina enriquecida en el isotipo acetilado.....	49
Cuantificación del contenido de tubulina acetilada en preparaciones enriquecidas o empobrecidas en dicho isotipo.....	49



Comparación de propiedades entre preparaciones de tubulina enriquecidas o empobrecidas en el isotipo acetilado.....	51
Actividad deacetilasa a lo largo del ciclado de tubulina.....	52
<u>Capítulo II: Desarrollo de un método de cuantificación de tubulina acetilada.....</u>	55
Acetilación química de tubulina utilizando anhídrido acético.....	55
Método de cuantificación de tubulina acetilada.....	56
Condición de máxima acetilación.....	56
Cantidad de tubulina total en muestras acetiladas o no químicamente.....	56
Afinidad y especificidad del anticuerpo 6-11B-1 por Lys40 acetilada en muestras acetiladas químicamente.....	58
Proporcionalidad entre cantidad de tubulina acetilada y densidad óptica en Western blot.....	59
Validación experimental del método.....	60
Efecto de detergentes sobre la acetilación química.....	61
Cuantificación de tubulina acetilada en cultivos celulares.....	62
<u>Capítulo III: Caracterización bioquímica del complejo tubulina acetilada-PMCA.....</u>	65
Interacción de PMCA con microtúbulos <i>in vitro</i>	65
Participación de MAPs en la asociación PMCA-microtúbulos <i>in vitro</i>	65
Asociación de PMCA a microtúbulos en función del dinamismo de los mismos.	66
DISCUSIÓN.....	69
MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
REFERENCIAS.....	85

ABREVIATURAS

+TIP: *Microtubule plus-end Tracking Proteins.*

α -TAT1: *α -Tubulin Acetyl-Transferase 1*, acetiltransferasa de α -tubulina 1

γ TuRCs: *γ -tubulin Ring Complexes*, complejos de anillos de γ -tubulina.

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ARNm: Ácido desoxiribonucleico mensajero

ATP: Adenosina trifosfato

CAD: *Cath.a-differentiated*, línea celular inmortalizada derivada de un subclón de una línea celular catecolaminérgica de tumor neuronal.

CHIP: *Carboxy terminus of Hsp70-Interacting Protein.*

CHO: *Chinese Hamster Ovary*, línea celular inmortalizada derivada de ovario de hámster chino.

CI₅₀: *Concentración Inhibitoria del 50%*

CLIP-115: *Cytoplasmic Linker Protein-170.*

CLIP-170: *Cytoplasmic Linker Protein-170.*

COS: línea celular inmortalizada derivada de riñón de mono verde africano.

CPP: *Cytosolic Carboxipeptidase.*

CYLD: *Cylindromatosis.*

DO: *Densidad Óptica* de una banda de Western blot.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12.* Medio de cultivo de células.

EB: *End Binding protein.*

EGTA: *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*,

Elp3: *Elongator complex protein 3.*

GNATs: *Gcn5 related N-acetyltransferases*, familia de enzimas acetiltransferasas.

GSK3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3b.*

GTP: *Guanosina Trifosfato*

HDAC6: *Histone Deacetylase 6*, histona deacetilasa 6.

HDAC5: *Histone Deacetylase 5*, histonas deacetilasa 5.

HSP90: *Heat Shock Protein 90.*

IL-10: *InterLeuquina 10*

kDa: *kilo Dalton.*

KIF2A: *Kinesin Superfamily protein 2A.*

KO: *knockout.* Organismo manipulado genéticamente para que no exprese una proteína endógena.

Lys: L-lisina

LPS: *LipoPoliSacárido.*

MAP: *Microtubule Associated Protein.* Proteína asociada a microtúbulo.

MAPK p38: *Mitogen-Activated Protein Kinase p38.*

MEC-17: *Alpha Tubulin N-Acetyltransferase 1*, Ortólogo de α -TAT1

MCAK: *Mitotic Centromere-Associated Kinesin*, kinesina mitótica asociada al centromero.

mDia2: *Protein diaphanous homolog 3.*

MTOC: *MicroTubule Organizing Center*, Centro Organizador de Microtúbulos

NF- κ β : *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

P-ATPasas: familia de bomba de iones caracterizadas por formar un intermediario fosforilado durante su ciclo de reacción.

PBS: *Phosphate Buffer Saline.* Buffer fosfato salino.

PKC α : *Protein Kinase C alfa.*



PMCA: *Plasma Membrane Calcium ATPase*, ATPasa de calcio de membrana plasmática.

PMSF: *PhenylMethylSulfonyl Fluoride*. Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, inhibidor de proteasas.

PMVs: *Plasma Membrane Vesicles*, vesículas de membrana plasmática.

RunX2: *Runt-related transcription factor 2*.

Rheb: *Ras homolog enriched in brain*.

SDS: *Sodium DodecylSulfate*, dodecilsulfato de sodio, detergente aniónico.

SDS-PAGE: *SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

SERCA: *Sarco endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*, ATPasa de Calcio de retículo endoplásmico.

Sirt2: *Sirtuin 2*.

SN_x: *SobreNadante número X*.

SPCA: *Secretory Pathway Calcium ATPase*, ATPasa de calcio de la vía secretoria.

STOP: *Stable Tubule-Only Polypeptide*.

Tat: *Trans-Activator of Transcription*. Proteína del virus de inmunodeficiencia humano.

TPPP/P25: *Tubulin Polymerization-Promoting Protein/p25*, proteína promotora de la polimerización de tubulina p/25.

TRIM: *Tripartite motif-containing 50*, E3 ubiquitín ligasa.

TRNs: *Touch receptor neurons*, neuronas sensibles al tacto de *C. elegans*.

TSA: Trichostatin A

TLL: *Tubulin Tyrosine Ligase Like proteins*.

ZnF-UBP: *zinc-finger ubiquitin binding domain*

RESUMEN

MARCO TEÓRICO Y OBJETIVOS

Los microtúbulos son tubos cilíndricos huecos de 25 nm de diámetro (externo) formados por dímeros de α/β -Tubulina. Sus principales funciones son la de servir de carriles por donde se transportan y anclan elementos celulares, y de otorgar resistencia mecánica a cilios y flagelos y a la célula en su conjunto. De esta manera participan en procesos celulares como la separación de cromosomas durante la mitosis/meiosis, la diferenciación y migración celular y la traducción de señales. Las propiedades de los microtúbulos, y por ende las funciones que cumplen, pueden ser alteradas variando la identidad de los dímeros que los componen. Esta variedad surge de los diferentes isotipos genéticos de tubulina y de las modificaciones postraduccionales que estos pueden sufrir.

Una de las modificaciones postraduccionales de la tubulina es la acetilación. La misma consta del agregado de un acetilo sobre el grupo amino épsilon de la lisina 40 de la molécula de α -tubulina. Esta acción es llevada a cabo en animales por la acetiltransferasa de tubulina α -TAT1 y la reacción inversa por la enzima histona deacetilasa 6 (HDAC6). Esta modificación postraduccionales fue descrita hace más de 30 años y al día de la fecha hay un volumen importante de trabajos publicados al respecto. Sin embargo, el rol fisiológico que cumple no es claro y aún es tema de debate y disenso. En parte, esto se debe a limitaciones técnicas encontradas a la hora de estudiar la función de la acetilación de tubulina. La mayoría de los trabajos se han basado exclusivamente en experimentos realizados utilizando cultivos celulares, en los cuales modifican los niveles de tubulina acetilada (modificando la actividad de HDAC6 o α -TAT1) y observan el fenotipo celular. En este sistema experimental es sumamente complicado modificar el estado de acetilación de tubulina sin alterar otros parámetros celulares en paralelo (inclusive otras modificaciones postraduccionales de la tubulina) ya que las enzimas tienen efectos sobre los microtúbulos que son independientes de la acetilación de tubulina y además modifican postraduccionales otras proteínas. Sumado a eso, las conclusiones de estos trabajos derivan del análisis de cambios relativos en los niveles de tubulina acetilada, sin conocimiento de qué porcentaje de la tubulina se encuentra acetilada. En estas condiciones, establecer una relación de causalidad entre un fenómeno celular y la acetilación de tubulina se torna dificultoso y arriesgado. Una manera de sobrellevar esta dificultad es apoyar los experimentos de biología celular con experimentos bioquímicos en donde se trabaje con preparaciones de tubulina pura que difieran exclusivamente en su grado de acetilación. Sin embargo, la tubulina purificada (por el método de ensamble/desensamble) posee muy poco o nada del isotipo acetilado. Es por esto que en este trabajo de tesis nos propusimos desarrollar tanto un método de purificación de tubulina enriquecida en el isotipo acetilado como un método simple de cuantificación del porcentaje de tubulina que se encuentra acetilada en una muestra.

Por otro lado, poco tiempo antes del comienzo de este trabajo se había determinado que la tubulina acetilada, pero no la no acetilada, podía unirse a e inhibir la actividad catalítica de la bomba de calcio de membrana plasmática (PMCA), una de las principales encargadas de la regulación fina de los niveles citosólicos de calcio. En este trabajo también nos propusimos hacer un estudio bioquímico del complejo tubulina acetilada-PMCA utilizando la preparación de tubulina purificada enriquecida en el isotipo acetilado aquí desarrollada.



RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En primer lugar se determinó que en un homogenato de cerebro de rata hay una alta actividad deacetilasa de tubulina, la cual es la responsable de que en preparaciones de tubulina purificada por el método tradicional de ensamble/desensamble haya muy poco o nada de tubulina acetilada. Utilizando inhibidores específicos de las diferentes deacetilasas se determinó que la enzima responsable de esta actividad es la HDAC6. En vista de esto, se diseñó un protocolo de purificación de tubulina enriquecida en el isotipo acetilado basado en el agregado de Trichostatin A (TSA, un inhibidor de HDAC6) en todos los buffers del protocolo de purificación. Utilizando este método se obtuvo una preparación de tubulina purificada por 3 ciclos de ensamble/desensamble que contiene un 64% de tubulina acetilada respecto de tubulina total. En contraste, cuando no se agrega TSA en los buffers de purificación se obtiene una preparación de tubulina que posee alrededor de un 0,2% de tubulina acetilada. Ambas preparaciones son análogas en cuanto al estado de tirosinación de tubulina (otra modificación postraducción de tubulina), la cinética de polimerización o depolimerización en frío y composición proteica. Por ende son ideales para experimentos bioquímicos de comparación entre tubulina acetilada y no acetilada.

En segundo lugar se desarrolló un método de cuantificación del porcentaje de la tubulina que se encuentra acetilada en una muestra. El método consiste en la acetilación química (con anhídrido acético) de una alícuota de la muestra a analizar y luego la comparación directa entre la muestra sin acetilar químicamente y la acetilada químicamente mediante Western blot revelado con el anticuerpo específico para tubulina acetilada 6-11B-1. Dado que ni el tritón X-100 ni el SDS afectan la reacción de acetilación química, este método también puede ser utilizado para cuantificar muestras en las que se requiera de detergentes para la extracción de tubulina, como cultivos celulares.

Por último, mediante experimentos de coprecipitación de proteínas de membrana disueltas en detergente con microtúbulos se determinó que la PMCA es capaz de unirse a microtúbulos. Además, se determinó que esta interacción es independiente tanto de la presencia de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) como del dinamismo de los microtúbulos.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados oportunamente (Carbajal et al., 2012; Chesta et al., 2013)

INTRODUCCIÓN



Citoesqueleto

El citoesqueleto de células animales está conformado por filamentos intermedios, microfilamentos (filamentos de actina) y microtúbulos. Actualmente también se propone a los filamentos de septinas como parte del citoesqueleto (Mostowy y Cossart, 2012).

Se trata de un sistema filamentososo distribuido en todo el citoplasma. El correcto funcionamiento de este sistema está basado en la resistencia mecánica de los mismos. Haciendo uso de esta resistencia es que la célula puede mantener o cambiar su organización interna (polarizada o no), anclarse a la matriz extracelular, desplazarse por la misma o adquirir y mantener una determinada forma. Son estructuras versátiles, capaces de reordenarse con facilidad que se influyen mutuamente y actúan de manera coordinada para poder adaptar a la célula a los diferentes contextos a los que se enfrenta.

A continuación se hará una breve descripción de los filamentos intermedios, los filamentos de septinas y los microfilamentos y una descripción mucho más detallada de los microtúbulos por ser tema central de este trabajo.

Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios tienen un diámetro entre 7 y 12 nm, intermedio entre el de los microtúbulos (25 nm) y el de los microfilamentos (5-9 nm). Son polímeros de proteínas fibrosas que forman fibras flexibles sin polaridad estructural, que forman una malla en el citoplasma y rodeando la membrana interna nuclear (lámina nuclear) otorgándoles resistencia mecánica (Fig. 1). En humanos son más de 70 proteínas, agrupadas en 6 familias, las que pueden formar filamentos intermedios.

Aunque pueden reordenarse, son estructuras más estáticas que los microtúbulos o los microfilamentos y dado que no hay mecanoenzimas (enzimas que generan movimiento) que se asocien a estos filamentos no están involucrados en la producción de movimiento.

Los filamentos intermedios conectan las células epiteliales entre sí y a la matriz extracelular (a través de desmosomas y hemidesmosomas respectivamente) confiriéndole resistencia mecánica al tejido en su conjunto. También forman estructuras extracelulares como el pelo o las uñas.

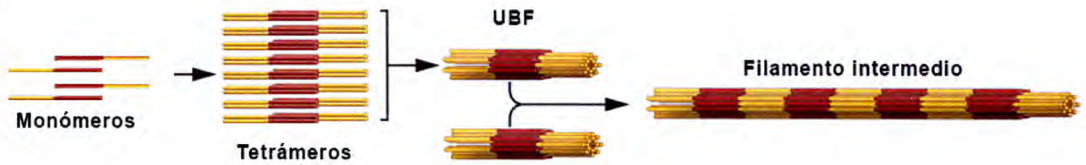
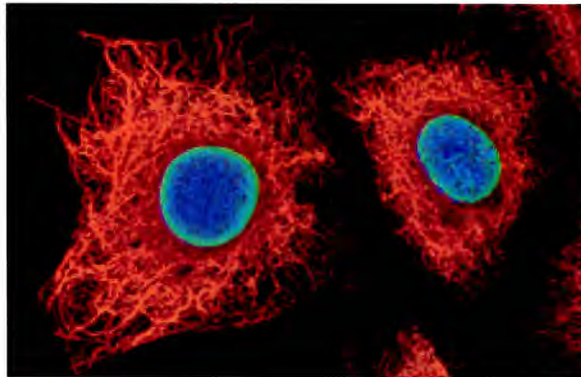
A**B**

Figura 1: Filamentos intermedios

(A) Representación esquemática que muestra cómo se asocian proteínas de vimentina para formar un filamento intermedio. 4 monómeros de vimentina se unen de manera antiparalela para formar un tetrámero. Ocho tetrámeros se unen para formar la UBF (unidad básica del filamento) y estas se unen longitudinalmente para formar el filamento. Cada monómero está representado como una barra pintada de amarillo y rojo para esquematizar la polaridad de la proteína (B) Inmunofluorescencia de células animales. En rojo se marcan los filamentos intermedios (FIs) compuestos de vimentina, en verde FIs compuestos por laminina A y en azul se marca el ADN con DAPI. Ambas imágenes fueron adaptadas de Herrmann et al., 2009.

Filamentos de septinas

Originalmente descubiertas en el septum de levaduras en división, las septinas se han descrito en prácticamente todos los eucariotas, incluido el humano (Cao et al., 2007; Nishihama et al., 2011; Pan et al., 2007). Las septinas son proteínas GTPasas de 30-65 kDa de masa que tienen la capacidad de hetero-oligomerizar para formar filamentos no polares, los cuales se asocian entre ellos para formar estructuras de mayor complejidad que comprenden filamentos, anillos y estructuras en forma de jaula (Fig. 2). Estas estructuras son más estables que los microfilamentos y los microtúbulos y sirven como estructuras de andamiaje o como barreras difusionales (Mostowy y Cossart, 2012).

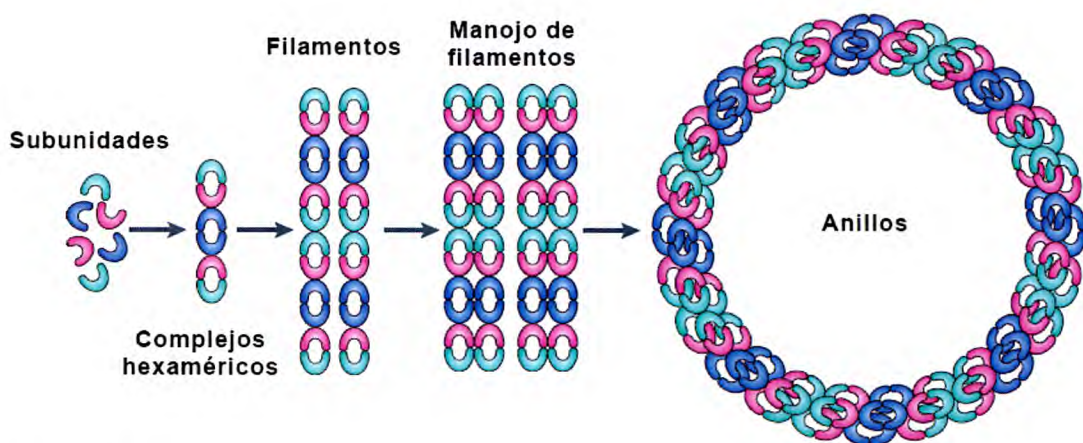


Figura 2: Filamentos de septina

Representación esquemática de septinas y las estructuras que estas forman. Diferentes subunidades de septina (representadas con diferentes colores) se unen en complejos hexaméricos, los cuales se unen entre sí para formar filamentos, los cuales se agrupan en manojos y estos forman supraestructuras como anillos. Figura adaptada del trabajo de Mostowy y Cossart (2012).

Microfilamentos

Los microfilamentos son fibras de 5-9 nm de diámetro, formados por la polimerización de la proteína globular actina en una doble hebra helicoidal (Fig. 3A). Dado que las subunidades de actina se unen entre sí cola con cabeza, el microfilamento que forman es una estructura polar cuyos extremos difieren entre sí. De un lado del filamento se encuentra el “extremo (+)”, cuya dinámica de polimerización y depolimerización es más rápida, y del otro se encuentra el llamado “extremo (-)”, cuya dinámica de polimerización y depolimerización es más lenta.

En las células, estos filamentos pueden asociarse entre sí a través de proteínas entrecruzantes para formar diferentes supraestructuras que cumplen diversas funciones: por debajo de la membrana celular los filamentos de actina forman el córtex celular. El mismo es una red de filamentos de actina entrecruzados que, gracias a su asociación con la proteína motora miosina, tiene la capacidad de contraerse. El mismo tiene como principales funciones las de darle forma y rigidez a la membrana plasmática así como transportar vesículas endo y exocíticas. Por otro lado, en células migratorias (como leucocitos o fibroblastos) los microfilamentos forman una red en el frente de migración que, a través de la fuerza generada por la polimerización de actina, es la principal responsable de empujar la membrana plasmática hacia adelante y así sustentar el proceso migratorio. Los microfilamentos también se asocian entre ellos y con miosina formando manojos contráctiles llamados fibras de estrés (Fig. 3B), las cuales le permiten a la célula encogerse y de esta manera colaboran con el proceso migratorio. Los microfilamentos también cumplen funciones importantes durante la mitosis y meiosis ya que en etapas tempranas de las mismas colaboran con el posicionamiento de los centrosomas que luego forman el huso mitótico y en etapas más tardías, específicamente durante la citocinesis, junto con miosina forman el anillo contráctil que divide la célula madre en dos células hijas. En células musculares se asocian también con miosina en una estructura muy particular la cual es responsable de la contractilidad muscular.

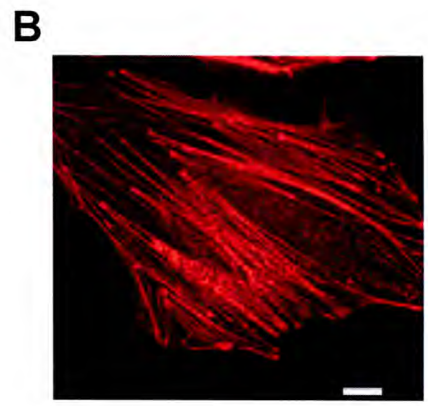
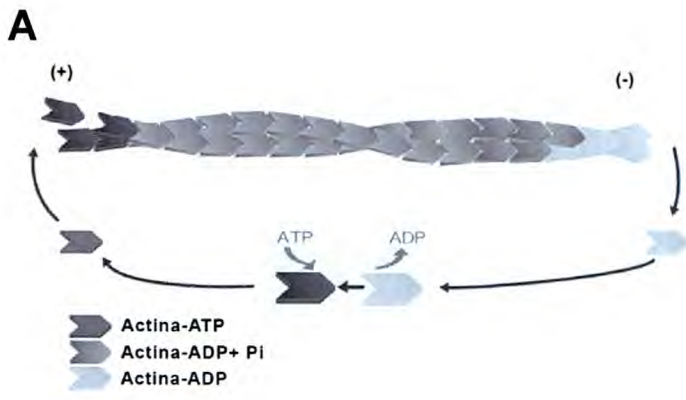


Figura 3: Filamentos de actina

(A) Representación esquemática de un filamento de actina. A la izquierda se encuentra el extremo (+) y a la derecha el extremo (-). Las moléculas de actina en solución se encuentran unidas a una molécula de ATP. Una vez que se unen al microfilamento lo hidrolizan y al tiempo liberan el fosfato. La actina unida a ADP es más propensa a desensamblarse. Figura adaptada del trabajo de Lee y Dominguez (2010). (B) Actina de células HeLa visualizada por inmunofluorescencia. Lo que se observa principalmente son fibras de estrés. Barra de escala corresponde a 10 μm . Imagen adaptada del trabajo de Heng y Koh (2010)

Microtúbulos

Estructura, función y características generales

Los microtúbulos, a diferencia de los filamentos intermedios y los microfilamentos, no son estructuras fibrilares sino que son cilindros huecos, de unos 25 nm de diámetro externo y de longitud variable, pudiendo medir desde 1 a más de 100 micrometros de largo (Bray y Bunge, 1981). Su principal función es la de servir como carriles para el transporte de vesículas, organelas, cromosomas, ARNm, etc., y/o la inmovilización de elementos subcelulares, y la de dar sustento mecánico a cilias y flagelos así como a la célula en su conjunto.

Estructuralmente están formados por la asociación lateral de 13 protofilamentos¹ los cuales a su vez están formados por la asociación lineal, con ordenamiento cola con cabeza, de heterodímeros de α y β tubulina (Fig. 4). Dado que los heterodímeros se encuentran alineados en paralelo en el microtúbulo, el mismo es una estructura polar, con un extremo que expone α -tubulina (extremo (-)) y el otro decorado por β -tubulina (extremo (+)). Estos extremos además de diferir en la subunidad de tubulina que los decora, tienen diferentes dinámicas de polimerización y de depolimerización: el extremo (+) polimeriza más rápido y depolimeriza un poco más lento que el extremo (-) (Walker et al., 1988).

Otra característica intrínseca de los microtúbulos que sirve a su función es la llamada inestabilidad dinámica. Este término fue acuñado en el año 1984 por Mitchison y Kirschner y describe el comportamiento de los microtúbulos, tanto *in vitro* como *in vivo*, de alternar constantemente entre fases de sostenida elongación y fases de sostenido acortamiento.

¹ En la mayoría de las células animales, aunque hay excepciones (Burton et al., 1975; Chalfie and Thomson, 1982; Nagano and Suzuki, 1975). Polimerizados *in vitro* pueden tener entre 12 y 16 (Pierson et al., 1978).

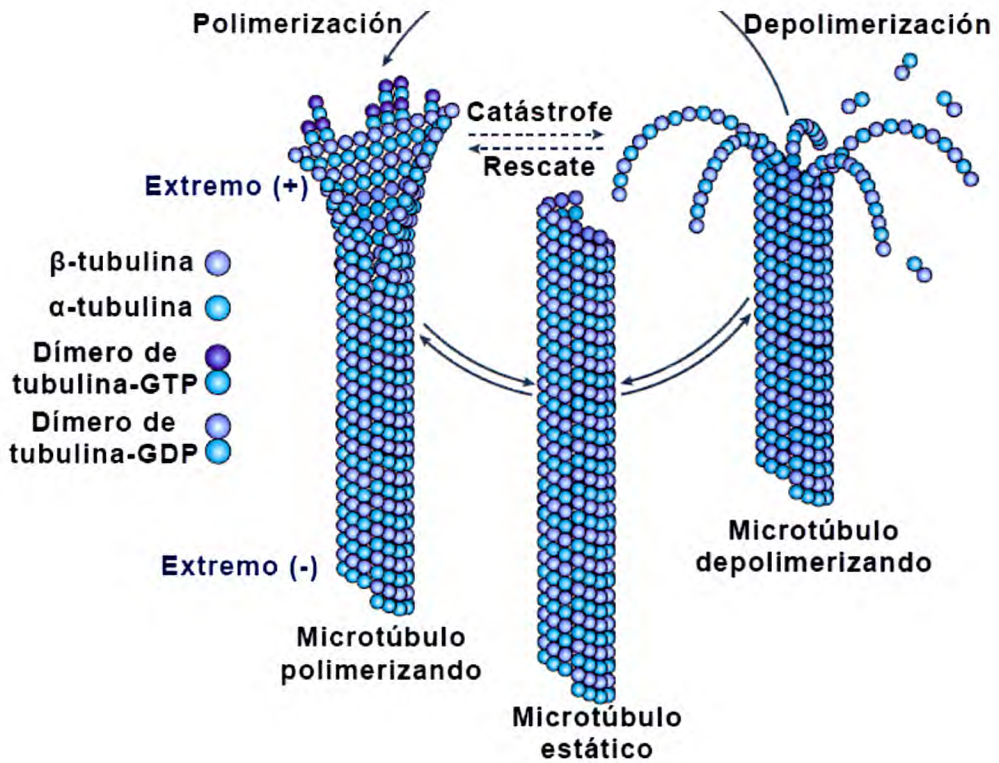


Figura 4: Microtúbulos

Representación esquemática de microtúbulos en crecimiento, estáticos o depolimerizándose. Figura adaptada del trabajo de Conde y Cáceres (2009).

Las transiciones de elongación a acortamiento se llaman eventos de catástrofe y la inversa eventos de rescate (Fig. 4). Mediante este comportamiento dinámico, el cual puede ser regulado mediante diferentes mecanismos (ver más adelante), los microtúbulos pueden explorar el citoplasma en la célula y eventualmente estabilizarse al encuentro de pistas moleculares concretas. La teoría más aceptada para explicar este comportamiento es la teoría del “capuchón de GTP” (Mitchison y Kirschner, 1984). La misma se basa en lo siguiente: ambas subunidades de tubulina unen GTP y, mientras el heterodímero esté en solución (sin formar parte de un microtúbulo), el mismo contendrá dos moléculas de GTP unidas (tubulina GTP). Sin embargo, al poco tiempo de incorporarse a un microtúbulo la molécula de β-tubulina hidroliza su molécula de GTP, liberando el fosfato y reteniendo el GDP (tubulina GDP) (Weisenberg et al., 1976). Los protofilamentos formados por tubulina GDP tienen una conformación más curva (hacia afuera del microtúbulo) que aquellos formados por tubulina GTP (ver esquema de microtúbulo en depolimerización, Fig. 4) (Hyman et al., 1995; Muller-Reichert et al., 1998; Wang y Nogales, 2005), de manera que al hidrolizarse el GTP se genera un estrés en la pared del microtúbulo que promueve la depolimerización del mismo. Sin embargo, esto no sucede mientras haya tubulina GTP en la punta del microtúbulo ya que las mismas forman un capuchón estable que previene la depolimerización. Entonces, si la velocidad de adición de heterodímeros en la punta del microtúbulo es mayor que la velocidad de hidrólisis del GTP, siempre habrá un capuchón de

tubulina GTP en la punta que impedirá la depolimerización del microtúbulo. Cuando la velocidad de adición de tubulina sea superada por la velocidad de hidrólisis del GTP se perderá ese capuchón y el microtúbulo se depolimerizará extensivamente (catástrofe) hasta que, a través de un evento de rescate, el microtúbulo comience su elongación nuevamente. Los eventos de rescate suceden de manera aparentemente aleatoria y su mecanismo es aún objeto de estudio.

En cuanto a sus características mecánicas, los microtúbulos son mucho más rígidos que los otros filamentos y soportan más presión lateral antes de curvarse (Blanchoin et al., 2014; Pampaloni et al., 2006). Esta propiedad permite a los microtúbulos actuar tanto como largos carriles por donde se transporta material celular como de elementos estructurales que resisten alta compresión.

Se puede promover la polimerización así como la depolimerización de microtúbulos utilizando tanto medios físicos como químicos. Entre 30 y 37 °C se promueve la polimerización de microtúbulos, mientras que a temperaturas menores de 10 °C se promueve su depolimerización. El calcio en concentraciones milimolares y sales como el cloruro de sodio o cloruro de potasio en concentraciones mayores a 0.2 M promueven la depolimerización de microtúbulos. Además, existen drogas que promueven o inhiben la polimerización y son utilizadas en la clínica como anticancerígenos. La droga polimerizante más popular es el paclitaxel, también conocido por su nombre comercial Taxol (Wani et al., 1971). El mismo actúa uniéndose a la subunidad β de tubulina en la parte interna del microtúbulo y de esta manera estabiliza el microtúbulo, impidiendo su depolimerización (Horwitz, 1994). Entre las drogas depolimerizantes más utilizadas se encuentran el nocodazol, la colchicina y la vinblastina, los cuales se unen al dímero de tubulina e impiden su polimerización. Estas drogas son utilizadas ampliamente en investigación para modificar el estado global de la red de microtúbulos, ya sea simplemente inhibiendo su dinamismo (bajas concentraciones de taxol o nocodazol), o aumentando o disminuyendo la población total de microtúbulos (concentraciones mayores de taxol o nocodazol respectivamente).

Organización de los microtúbulos en la célula

Dentro de la célula los microtúbulos se organizan de diferentes maneras dependiendo del tipo celular y la etapa del ciclo celular en que se encuentre.

En células animales no diferenciadas (y en algunas diferenciadas) los microtúbulos irradian desde el centro hacia la periferia de la célula, con sus extremos menos nucleados y estabilizados por el centrosoma (Fig. 5A). El centrosoma, ubicado al lado del núcleo, es una de las varias estructuras que pueden funcionar como MTOC (Centro Organizador de Microtúbulos) y está compuesto por un par de centriolos rodeados por material pericentriolar (Fig. 5B).

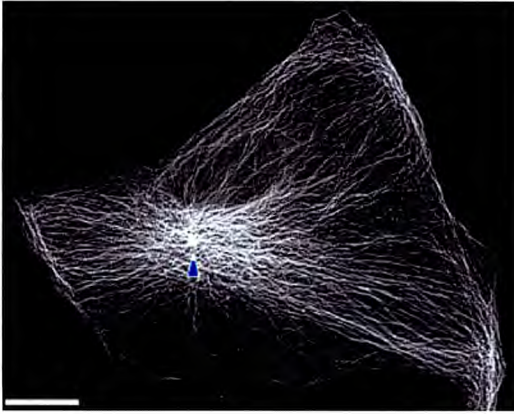
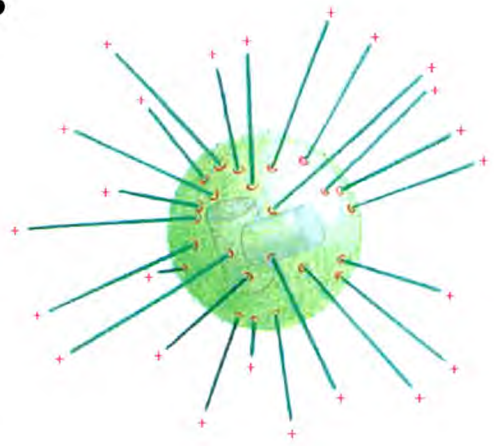
A**B**

Figura 5: (A) Inmunofluorescencia de microtúbulos de células BS-C-1 en interfase. Con una cabeza de flecha azul se marca la posición del centrosoma. Barra de escala = 20 μ m. Imagen adaptada del trabajo de Burakov et al. (2003) (B) Representación esquemática de un centrosoma: en el centro se encuentran los dos centríolos con forma de barril orientados perpendicularmente y rodeando estos centríolos una esfera que representa el material pericentriolar. Sobre esta esfera en rojo se esquematizan los γ TuRCs y sobre ellos se anclan los microtúbulos a través de sus extremos (-). Imagen adaptada del libro de Alberts et al (2008)

Dentro del material pericentriolar se encuentran los γ TuRCs (complejos de anillos de γ -tubulina), principales responsables de nuclear y estabilizar microtúbulos tanto en el centrosoma como en MTOCs no centrosomales (Teixidó-Travesa et al., 2012). En células animales diferenciadas la organización de los microtúbulos es más variada. En células ciliadas el centrosoma está ubicado en la periferia celular donde uno de los centríolos se ha convertido en cuerpo basal, el cual nuclea los microtúbulos que forman el axonema, estructura básica de la cilia (Kobayashi y Dynlacht, 2011). En otras células diferenciadas los microtúbulos se encuentran nucleados por estructuras no centrosomales: en células musculares diferenciadas, el centrosoma ha desaparecido y las proteínas que componían el material pericentriolar, entre ellas los γ TuRCs, se encuentran en la membrana nuclear, la cual oficia de MTOC. En células epiteliales, las cuales también contienen un centrosoma, la mayoría de los microtúbulos se alinean en paralelo con dirección apico-basal, con sus extremos (-) anclados en la membrana basal (no en el centrosoma) (Lüders y Stearns, 2007). En plantas superiores por otro lado, ninguna célula contiene centrosoma y durante la interfase los microtúbulos se encuentran nucleados por MTOCs dispersos en la membrana plasmática e inclusive por los mismos microtúbulos (Fishel y Dixit, 2013).

En células que se encuentran en división celular el centrosoma se duplica al mismo tiempo que el ADN y al comienzo de la mitosis los dos centrosomas se posicionan en extremos opuestos de la célula. Desde cada uno de ellos irradian microtúbulos tanto hacia el centro de la célula como hacia la periferia (estos últimos llamados microtúbulos astrales). Los microtúbulos que irradian hacia el centro son muy dinámicos y tras la ruptura de la envoltura nuclear contactan con los kinetocoros de los cromosomas y se estabilizan formando el huso mitótico (Fig. 6). Los microtúbulos astrales determinan la orientación del huso mitótico. Una vez formado el huso mitótico, a través de fuerzas de tensión y empuje generadas por motores moleculares que caminan sobre microtúbulos y por la propia fuerza generada por la polimerización y

depolymerización de tubulina, se alinean los cromosomas en el centro de la célula (metafase) y luego, con la fuerza generada por la depolymerización de los microtúbulos unidos a los cinetocoros, se separan las cromátidas hermanas, llevando una para cada polo (anafase). (Dunn, 2000)

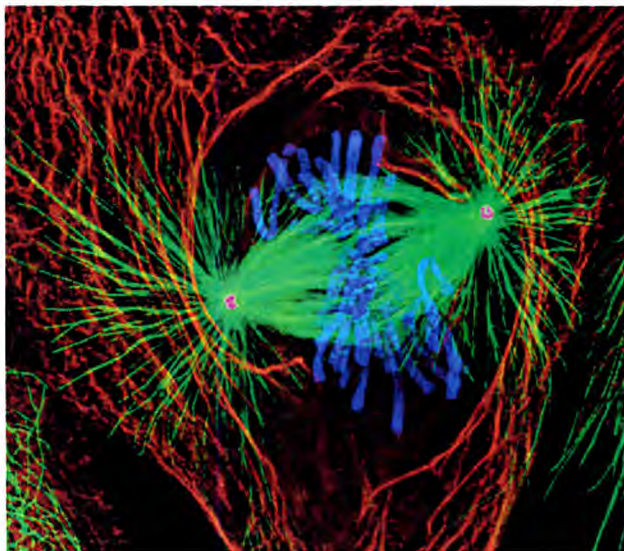


Figura 6: Huso mitótico

Inmunofluorescencia de células de pulmón de salamandra (*Notophthalmus viridescens*) en mitosis (metafase). En verde se ven los microtúbulos, en azul los cromosomas, en magenta los centrosomas y en rojo filamentos intermedios. Fotografía ganadora de la competición de microscopía óptica de Olympus/Nature (Dunn, 2000).

Proteínas que interaccionan con tubulina y/o microtúbulos

Con el transcurso del tiempo se han descubierto gran cantidad de proteínas que interaccionan con tubulina y/o microtúbulos. Estas proteínas difieren tanto en sus funciones, como estructuras y ubicaciones subcelulares. Ya en el año 1989 un estudio de identificación de proteínas asociadas a microtúbulos arrojaba más de 50 candidatos (Kellogg et al., 1989). Estudios posteriores, apoyados en técnicas de proteómica, identificaron más de 700 proteínas asociadas al huso mitótico (Bonner et al., 2011; Sauer et al., 2005) y más 550 asociadas a microtúbulos en cerebros de mamíferos (Kozielski et al., 2011), y la lista continua creciendo. Aquí se hará un pequeño resumen de aquellas mejor caracterizadas y las más relevantes para este trabajo de tesis.

MAPs clásicas y otras

Las MAPs (*Microtubule Associated Proteins*) originalmente fueron definidas bajo un criterio operacional como aquellas proteínas que co-ciclan con tubulina en una relación estequiométrica constante durante un proceso de purificación por ciclos de ensamble/desensamble de microtúbulos (ver métodos de purificación más adelante) (Maccioni y Cambiazo, 1995). Al día de la fecha en la literatura se observa el uso del término MAPs de manera menos estricta para referirse a proteínas cuya principal función (tal se la comprende) implica su asociación a microtúbulos, aunque estas no co-ciclen con tubulina. Bajo esta nueva definición se clasifican como MAPs los motores moleculares, las +TIPs y otras. En este trabajo se referirá a las

MAPs según la definición más abarcativa y mediante el término MAPs clásicas se referirá a la definición original de MAPs. Las MAPs clásicas, entonces, comprenden las proteínas de la familia de las MAP-1 (Halpain y Dehmelt, 2006) y MAP-2/Tau (Dehmelt y Halpain, 2005). La mayoría de estas proteínas se encuentran exclusivamente en neuronas y se unen a la pared del microtúbulo, estabilizándolo y promoviendo su polimerización, así como también conectando los microtúbulos a otras estructuras/proteínas como los microfilamentos de actina.

Existe un grupo de enzimas llamadas en inglés *microtubule severing enzymes*, lo cual se podría traducir como enzimas que cortan los microtúbulos. Comprenden las proteínas spastina, katanina y fidgetin y se caracterizan por cortar los microtúbulos a través de un mecanismo dependiente de ATP. Son importantes en los procesos de mitosis, morfogénesis neuronal, ensamble y desensamble de cilias y otras funciones (Sharp y Ross, 2012).

Otra proteína que se une y estabiliza microtúbulos, particularmente frente a la depolimerización inducida por frío es la STOP (*stable tubule-only polypeptide*) (Guillaud et al., 1998; Job et al., 1982).

Motores moleculares

Los microtúbulos sirven como carriles por donde se transportan varios elementos subcelulares entre los que se encuentran organelas como las mitocondrias (Saxton y Hollenbeck, 2012) o fragmentos de otros microtúbulos (Baas y Mozgova, 2012; Konzack et al., 2007; Wang y Brown, 2002), cromosomas, vesículas lipídicas, complejos proteicos y hasta moléculas de ARNm (Jansen y Niessing, 2012). Las proteínas encargadas de mover estos elementos son los motores moleculares. Estas proteínas tienen la capacidad de unirse al microtúbulo por un lado, unir el elemento a transportar por otro (directa o indirectamente y de manera específica) y desplazarse sobre el microtúbulo de manera procesiva (mantienen la interacción con el microtúbulos tras varias rondas de catálisis) y unidireccional (ya que reconocen la polaridad del microtúbulo), a través de la energía provista por la hidrólisis de ATP. Están agrupadas en dos super familias: las kinesinas y las dineínas. Las kinesinas a su vez se agrupan en 14 subfamilias (en humanos hay descritos 45 genes de kinesinas) y funcionan como monómeros, dímeros, trímeros o tetrámeros, según la subfamilia. Algunas kinesinas, como las kinesina-1 (antes llamada KIF5 o simplemente kinesina), se mueven hacia el extremo (+) de los microtúbulos, mientras que otras como las kinesina-14, se mueven en la dirección opuesta (Hirokawa et al., 2009; Verhey et al., 2011). Las dineínas por su parte son grandes complejos multiproteicos (de aproximadamente 1.5 megadaltons) y están agrupadas en dos subfamilias: las dineínas citoplásmicas y las dineínas axonemales. Las dineínas citoplásmicas se encuentran en todo el citoplasma y participan del transporte intracelular, mientras que las dineínas axonemales se encuentran circunscriptas al axonema y son las responsables de generar la fuerza que mueve cilias y flagelos. Ambas se mueven hacia el extremo (-) del microtúbulo (Hirokawa et al., 2010).

En el ambiente celular en general hay más de un motor molecular asociado al elemento transportado, aumentando de esta manera la fuerza y la procesividad. Inclusive los motores asociados al elemento transportado suelen tener diferente direccionalidad, aumentando de esta manera la procesividad de los mismos y permitiendo a la carga esquivar obstáculos mediante un pequeño retroceso (Bryantseva y Zhapparova, 2012).

+TIPs

Otras proteínas que interactúan con microtúbulos son las llamadas +TIPs (*Plus End Tracking Proteins*). Estas proteínas se caracterizan por acumularse en el extremo (+) de microtúbulos en crecimiento. Desde esa posición exploran el citoplasma junto con los microtúbulos y así regulan e intermedian la interacción de esos microtúbulos con otras estructuras celulares y el dinamismo de los mismos. Por ejemplo, MCAK (*Mitotic Centromere-Associated Kinesin*) utiliza la energía provista por la hidrólisis de ATP para promover los eventos de catástrofe y por ende la depolimerización de los microtúbulos (Friel y Howard, 2011; Kinoshita et al., 2006; Kline-Smith y Walczak, 2002), mientras que la proteína XMAP (*Xenopus Microtubule Assembly Protein*) tienen el efecto contrario: promueven la polimerización de los microtúbulos (Gard y Kirschner, 1987; Vasquez et al., 1994). Otras, como las CLASPs (*CLIP Associating Protein*), median la interacción de microtúbulos con el córtex celular (Lansbergen et al., 2006). Otra +TIP llamada doublecortin, además de estabilizar los microtúbulos, restringe a 13 el número de protofilamentos que los forman (Fourniol et al., 2013, 2010; Moores et al., 2004).

La mayoría de las proteínas +TIP no tienen la capacidad intrínseca de reconocer el extremo más del microtúbulo en crecimiento sino que lo hacen a través de las proteínas de la familia EB (*End Binding*) las cuales sí poseen esa capacidad (Kumar y Wittmann, 2012).

Enzimas citosólicas

Muchas enzimas citosólicas pueden asociarse a microtúbulos. Estas incluyen aquellas encargadas de modificar postraduccionalmente la tubulina (y otras proteínas, ver más adelante) y otras que no poseen dicha función. Entre estas últimas se han descrito muchas enzimas relacionadas al metabolismo de glúcidos como la hexoquinasa (Wágner et al., 2001), la fosfofrutoquinasa (Lehotzky et al., 1993; Orosz et al., 1999), la piruvato kinasa (Vértessy et al., 1999) y la aldolasa (Ovádi y Orosz, 1992; Vértessy et al., 1997). Según estos trabajos hay una modulación recíproca entre el dinamismo de los microtúbulos y la actividad de estas enzimas.

Proteínas de membrana

La tubulina puede unirse a muchas proteínas de membrana y la función de estas interacciones en muchos casos es incierta. Entre las proteínas de membrana que interactúan con tubulina encontramos receptores como los TRPV (*Transient Receptor Potential Vanilloid*) (Goswami, 2012), el receptor de estrógeno (Azuma et al., 2004), el receptor de glutamato metabotrópico 7 (Ja et al., 2002) y otros (Wolff, 2009), así como también enzimas como el grupo de las P-ATPasas que incluyen a la Na^+/K^+ -ATPasa (Alonso et al., 1998; Vladimirova et al., 1995, 2002), la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática o PMCA (Monesterolo et al., 2008) y la H^+ -ATPasa (Campetelli et al., 2005). Para este último grupo (P-ATPasas) se determinó que la interacción, en todos los casos, resulta en la inhibición de la actividad catalítica de las bombas y que esta interacción sólo se efectúa con tubulina que está acetilada (modificación postraduccional, ver más adelante) (Campetelli et al., 2005; Casale et al., 2001; Monesterolo et al., 2008; Santander et al., 2006). Para el caso de la Na^+/K^+ -ATPasa también se determinó que no sólo la tubulina dimérica puede unirse a ella, sino que también los microtúbulos pueden hacerlo y que lo hacen directamente (sin proteínas intermediarias) a través del dominio citoplasmático 5 de la Na^+/K^+ -ATPasa (Zampar et al., 2009). Sin embargo, es incierto aún, cuál es el rol de esta interacción inhibitoria entre las P-ATPasas y tubulina y en qué contextos celulares se da.

Isoformas de tubulina

Parte de la asombrosa versatilidad de los microtúbulos para cumplir tan diversas tareas e interactuar con tantas proteínas viene dada y está regulada por la variedad de isoformas de tubulina que pueden formar los microtúbulos. Dicha variedad proviene de las isoformas genéticas de α y β -tubulina y de las modificaciones postraduccionales que estas pueden sufrir.

Isoformas genéticas

En vertebrados hay 6 isotipos genéticos de α -tubulina y 7 de β -tubulina. La composición de los heterodímeros en cuanto a isotipos genéticos, tanto para α como β -tubulina, varía según el órgano y el estado de desarrollo del individuo (Ludueña, 1998).

No es claro, particularmente para α -tubulina, si los diferentes isotipos son funcionalmente análogos o si es que pueden formar microtúbulos con diferentes propiedades. Para los isotipos de β -tubulina la información apunta a que no son análogos. Estos isotipos difieren principalmente en la región C-terminal, y en menor grado en la región N-terminal. A su vez, estas diferencias se encuentran conservadas para los distintos isotipos en diferentes especies (Sullivan y Cleveland, 1986). Diferentes isotipos de β -tubulina (en ausencia de MAPs) tienen diferentes dinámicas de polimerización y depolimerización *in vitro* (Lu y Ludueña, 1994; Panda et al., 1994) y diferente sensibilidad al taxol (Derry et al., 1997; Lu y Ludueña, 1993). Estas diferencias medidas *in vitro* tienen su correlación *in vivo* ya que el patrón de expresión de β -tubulina en células tumorales se relaciona con la resistencia de las mismas a la quimioterapia y a la agresividad del tumor (Kavallaris, 2010). Por otro lado, se ha descrito que diferentes motores moleculares interactúan de manera diferente (medido por velocidad de movimiento y grado de procesividad) con microtúbulos compuestos por diferentes subunidades de β -tubulina (Sirajuddin et al., 2014).

Finalmente, hay un abanico de enfermedades asociadas a mutaciones puntuales en diferentes isotipos tanto de α como β -tubulina, todas con base en el sistema nervioso (Tischfield et al., 2011).

Modificaciones postraduccionales de tubulina

El heterodímero de tubulina es objeto de muchas modificaciones postraduccionales, a saber: detirosinación (Barra et al., 1973), modificación $\Delta 2$ (Paturle-Lafanechère et al., 1991), poliglutamilación (Eddé et al., 1990), poliglicinación (Redeker et al., 1994), acetilación (L'Hernault y Rosenbaum, 1985), fosforilación (Gard y Kirschner, 1985), palmitoilación (Caron, 1997; Zambito and Wolff, 1997), ubiquitinación (Huang et al., 2009), sumoilación (Rosas-Acosta et al., 2005), arginilación (Wong et al., 2007) y glicosilación (Hino et al., 2003). De todas ellas, las más estudiadas y por ende mejor comprendidas son las primeras 5 y son las únicas de las que se hará mención en este trabajo, con especial énfasis en la acetilación.

A excepción de la acetilación, las modificaciones postraduccionales en cuestión se dan todas sobre el extremo C-terminal de una u otra tubulina (o ambas), de manera análoga a lo que sucede con las isoformas genéticas (difieren en sus aminoácidos C-terminales). El extremo C-terminal es un dominio desestructurado, altamente ácido (y por ende con carga negativa en pH fisiológico) que protruye hacia afuera del microtúbulo y lo decora. No es necesario para la

polimerización de la tubulina por lo que resulta lógico desde un punto de vista evolutivo y funcional que sea el sitio de mayor variabilidad.

Poliglutamilación

La poliglutamilación consta del agregado, de a un aminoácido por vez, de una cadena de ácidos glutámicos (usualmente 1 a 6 residuos) sobre la cadena lateral de otro ácido glutámico de la región C-terminal de α o β tubulina. El primer aminoácido se incorpora por unión isopeptídica entre el grupo amino α del aminoácido a incorporarse y el grupo γ -carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico de la tubulina. El resto de los ácidos glutámicos se incorporan sobre este ácido glutámico por uniones peptídicas tradicionales (Redeker et al., 1991). De esta manera esta modificación, al igual que la poliglicinación, difiere de las demás en que no son de tipo “todo o nada” sino abarcan una variedad de isoformas.

Al igual que las otras modificaciones descritas suceden preferentemente sobre microtúbulos (Audebert et al., 1993; Regnard et al., 1998) mientras que la reacción inversa se da tanto en tubulina dimérica como en microtúbulos (Audebert et al., 1993). Las enzimas involucradas son las TLL (*Tubulin Tyrosine Ligase Like proteins*) para la adición de residuos (van Dijk et al., 2007) y las CPP (*Cytosolic Carboxipeptidase*) para su remoción (Kalinina et al., 2007; Kimura et al., 2010; Rodríguez de la Vega et al., 2007; Rogowski et al., 2010). Ambas familias contienen varios miembros, los cuales poseen diferente especificidad de sustrato (algunos con múltiples sustratos) en cuanto a la subunidad de tubulina sobre la que actúan y el número de residuos de ácido glutámico que esta ya posee, y también difieren en cuanto al tipo de reacción que catalizan (adición o sustracción del primer aminoácido donde se ramifica la cadena o de los aminoácidos subsiguientes) (Garnham y Roll-Mecak, 2012). Además actúan sobre proteínas diferentes de tubulina (van Dijk et al., 2008; Rogowski et al., 2010) y algunos miembros de las TLL no poliglutamilan tubulina sino que la poliglicinan (ver más adelante)..

Esta modificación se encuentra principalmente en microtúbulos de neuronas (Audebert et al., 1993, 1994; Wolff et al., 1992), axonemas de cilias y flagelos (Bré et al., 1994; Lechtreck y Geimer, 2000) y en centriolos y cuerpos basales (Bobinac et al., 1998).

A nivel molecular la poliglutamilación de microtúbulos ha sido relacionada con una mayor afinidad de los mismos por kinesina-3 (Ikegami et al., 2007) y a una mayor sensibilidad a las enzimas cortadoras de microtúbulos spastina (Lacroix et al., 2010; Roll-Mecak y Vale, 2008) y katanina (Sharma et al., 2007).

A nivel organismo ratones *KO* (*knockout*) para diferentes TLLs tienen fenotipos principalmente relacionados a la estructura y funcionamiento de axonemas, como ser esterilidad y pérdida de la asimetría en el batido de cilias del tracto respiratorio (Campbell et al., 2002; Ikegami et al., 2010; Vogel et al., 2010). Por otro lado, ratones con defectos en el gen que codifica para la CPP1 (enzima que también cataliza la modificación $\Delta 2$ del extremo C-terminal de α -tubulina, ver más adelante) poseen degeneración en células de Purkinje (neuronas de gran tamaño) y también son estériles (Fernandez-Gonzalez et al., 2002; Mullen et al., 1976). Este fenotipo (degeneración de células de Purkinje) se ve aminorado si se disminuye la expresión de la TLL1 en cerebelo (principal poliglutamilasa en esas neuronas)(Rogowski et al., 2010).

Poliglicinación

La poliglicinación es análoga a la poliglutamilación solo que en vez de agregarse ácidos glutámicos se agregan glicinas. Las enzimas encargadas de la adición de residuos son las de la familia de las TTL y las encargadas de la remoción de los mismos son de identidad desconocida. A diferencia de la poliglutamilación la poliglicinación se encuentra restringida a los axonemas (Bré et al., 1996). Ratones knockdown para las dos TTLs responsables de la poliglicinación en ratones carecían de cilias móviles en las células ependimarias (glía que recubren los ventrículos del cerebro y el canal central de la espina vertebral) (Bosch Grau et al., 2013)

Detirosinación

La detirosinación es una modificación postraduccional reversible que consta de la remoción del aminoácido C-terminal de α -tubulina, el cual es tirosina (Argaraña et al., 1977; Barra et al., 1973, 1974; Hallak et al., 1977; Rodríguez et al., 1973; Valenzuela et al., 1981). La tubulina resultante de esta modificación expone un ácido glutámico en su extremo C-terminal (Arce et al., 1975) y por ende es llamada tubulina-Glu. La remoción de la tirosina es llevada a cabo por una carboxipeptidasa de identidad desconocida y la reacción reversa es llevada a cabo por la TTL (*Tubulin Tyrosine Ligase*)(Raybin y Flavin, 1977), la cual adiciona nuevamente la tirosina en un mecanismo ARNt independiente.

Usualmente se relaciona un mayor nivel de detirosinación de la tubulina de un microtúbulo con una mayor estabilidad del mismo (Baas y Black, 1990; Kreis, 1987), aunque hay excepciones y microtúbulos estables pueden tener muy poca tubulina detirosinada y viceversa, microtúbulos con mucha tubulina detirosinada ser muy dinámicos (Schulze et al., 1987). La relación causa-efecto entre detirosinación y estabilidad de microtúbulos (un microtúbulo es más estable porque está detirosinado, o está más detirosinado porque es más estable) es tema de discusión y parece que se da en ambos sentidos. Por un lado la detirosinación de tubulina no le infiere, *per se*, mayor estabilidad a los microtúbulos (Billger et al., 1991; Khawaja et al., 1988; Skoufias y Wilson, 1998; Webster et al., 1990) y dado que la reacción de detirosinación sucede preferentemente sobre microtúbulos (Arce y Barra, 1985; Kumar y Flavin, 1981), mientras que la de retirosinación sucede exclusivamente sobre tubulina dimérica (Arce et al., 1978; Gundersen et al., 1987; Prota et al., 2013; Raybin y Flavin, 1977; Szyk et al., 2011) resulta natural que microtúbulos estabilizados por otros mecanismos diferentes a la detirosinación posean mayores niveles de tubulina detirosinada que microtúbulos jóvenes o dinámicos. Por otro lado se ha descrito que la detirosinación de tubulina puede inhibir la actividad depolimeraza de las proteínas MCAK y KIF2A (Peris et al., 2009). De esta manera, *in vivo*, la detirosinación puede ser una causa indirecta de la estabilización de los microtúbulos.

También se ha relacionado el estado de tirosinación de la tubulina con una mayor o menor afinidad por proteínas no relacionadas directamente a la estabilidad de los microtúbulos, como las +TIPs CLIP-170, CLIP-115 y p150^{glued} (Badin-Larcon et al., 2004; Peris et al., 2006), o los motores moleculares kinesina-1 y kinesina-2 (Cai et al., 2009; Dunn et al., 2008; Konishi y Setou, 2009; Sirajuddin et al., 2014).

En cuanto a la función de esta modificación postraduccional a nivel organismo, ratones *KO* para la enzima TTL mueren al poco tiempo de nacidos debido a malformaciones del sistema nervioso. El resto de los órganos parecen ser normales (Erck et al., 2005). En humanos se ha correlacionado niveles bajos de la enzima TTL (y por ende altos niveles de tubulina detirosinada) con cánceres de mal pronóstico (Kato et al., 2004; Lafanechère et al., 1998; Mialhe et al., 2001; Soucek et al., 2006).

Modificación $\Delta 2$

La tubulina, una vez detirosinada, puede ser modificada aún más por la remoción del último aminoácido carboxilo terminal (el ácido glutámico) para dar lugar a la tubulina- $\Delta 2$. Esta modificación postraduccional es irreversible (Paturle-Lafanechère et al., 1991). La enzima responsable de esta modificación postraduccional fue identificada recientemente como la carboxipeptidasa citosólica 1 o CCP1 (Cytosolic *CarboxiPeptidase 1*) (Rogowski et al., 2010). No está claro cuáles son los efectos de esta modificación postraduccional pero es abundante en microtúbulos estables de células neuronales (Paturle-Lafanechère et al., 1994), y, dado que es una modificación irreversible, se especula que es una forma de bloquear microtúbulos muy estables en un estado de detirosinación permanente (Janke y Bulinski, 2011).

Acetilación

La acetilación de proteínas, entendida como la adición de un grupo acetilo a una proteína, tiene dos variantes: la α -N-acetilación y la acetilación de lisinas. La primera es una modificación co-traduccional, consta de la adición de un grupo acetilo en el extremo N-terminal de la proteína y generalmente se lo asocia con una función protectora ante la degradación (Van Damme et al., 2011). La acetilación de lisinas, por otro lado, es una modificación postraduccional reversible y consta de la adición de un grupo acetilo al grupo amino épsilon de una lisina. Las primeras proteínas descubiertas en poseer esta modificación postraduccional, y ciertamente las más estudiadas, son las histonas, las cuales determinan la estructura de la cromatina y de la expresión génica según su estado de acetilación (entre otras variables) (Kouzarides, 2007). Sin embargo la acetilación de lisinas se da sobre una amplia gama de proteínas y por ende cumple variadas funciones en las células (Choudhary et al., 2009; Kim et al., 2006; Webster et al., 2014; Zhao et al., 2010a).

La tubulina, puntualmente, puede ser acetilada en la Lys⁴⁰ de α -tubulina (L'Hernault y Rosenbaum, 1985), la Lys²⁵² de β -tubulina (Chu et al., 2011) y en otros sitios identificados por un estudio de proteómica (Choudhary et al., 2009) cuya relevancia *in vivo* resta corroborar. A su vez, de las dos primeras mencionadas, la acetilación de tubulina en la Lys⁴⁰ es la más estudiada y mejor caracterizada y el objeto de estudio de este trabajo. Por ende, a menos que se especifique lo contrario, siempre que se haga referencia a tubulina acetilada se estará haciendo mención a α -tubulina acetilada en su Lys⁴⁰.

La acetilación de tubulina es una modificación conservada a lo largo de diferentes especies que abarcan desde organismos unicelulares (como el alga verde *Chlamydomonas*

reinhardtii o el protozoario *Tetrahymena*) a mamíferos (L'Hernault y Rosenbaum, 1985; Piperno y Fuller, 1985; Piperno et al., 1987). Esta modificación postraduccional al igual que la detirosinación, y en menor grado la poliglutamilación, está asociada a una población de microtúbulos más estables (Ferreira y Cáceres, 1989; Lim et al., 1989; Piperno y Fuller, 1985; Piperno et al., 1987; Sale et al., 1988, 1988; Webster y Borisy, 1989; Wilson y Forer, 1989). Consecuentemente es abundante en neuronas, en axonemas de cilios y flagelos, en el cuerpo medio o cuerpo de Flemming, en microtúbulos estables del huso mitótico (Chu y Klymkowsky, 1989; Schatten et al., 1988; Wilson y Forer, 1989) y en centriolos (Piperno et al., 1987). Correspondientemente, los órganos en donde se encuentra mayor cantidad de tubulina acetilada (en ratón) son el cerebro en primer lugar, luego riñón, testículos, ovario, pulmón y en menor medida corazón (Kalebic et al., 2013a; Kim et al., 2013). De manera similar a la detirosinación, la relación causa-efecto entre acetilación de microtúbulos y estabilidad de los mismos no es clara y se discute más adelante (ver rol fisiológico de la acetilación de tubulina).

Molecularmente, la acetilación difiere sustancialmente de las demás modificaciones postraduccionales descritas más arriba en que no se da sobre el extremo C-terminal de tubulina, el cual protruye hacia afuera del microtúbulo, sino que se da sobre Lys⁴⁰, la cual se encuentra en el lado luminal del mismo (Nogales et al., 1999; Soppina et al., 2012).

Enzimas involucradas en la acetilación de tubulina

Acetiltransferasas: α -TAT1 y otras

La principal enzima encargada de acetilar tubulina en mamíferos (y muchos otros organismos) es la α -TAT1 (Alpha Tubulin N-Acetyltransferase 1, llamada MEC-17 (*Mechanosensory defective 17-* en *C. elegans*), una enzima de la familia de las GNATs (*Gcn5 related N-acetyltransferases*).

Para demostrar sin lugar a dudas que esta es la enzima encargada de acetilar tubulina (en aquellos organismos que poseen la enzima) dos grupos de investigación, en paralelo, realizaron los siguientes experimentos: 1) ensayos *in vitro* de actividad acetiltransferasa de la enzima sobre tubulina purificada, 2) *knockouts* (KO), *knockdowns* o sobreexpresantes del gen en células en cultivo de origen humano y la determinación de la variación de los niveles de tubulina acetilada como consecuencia de ello 3) organismos KO de esa enzima, los cuales incluyen el pez *Danio rerio* o pez cebra, el protozoario *Tetrahymena thermophila*, el nematodo *C. elegans* (Akella et al., 2010; Shida et al., 2010). En trabajos posteriores se generaron ratones KO de α -TAT1 (Kalebic et al., 2013a; Kim et al., 2013). En todos los organismos analizados disminuyó el nivel de tubulina acetilada respecto del organismo salvaje en alguno o todos los órganos examinados. En los ratones KO particularmente, no detectan tubulina acetilada en la mayoría de los tejidos (tejido nervioso, testículos, riñón, hígado, ovario, páncreas, corazón y fibroblastos embrionarios) y en aquellos que sí lo hacen (bazo y pulmón y tejido graso) el nivel es muy bajo y sustancialmente menor que el del animal salvaje, a excepción del tejido graso en donde no varía entre ambos animales. En el KO del pez *Danio rerio* las neuronas carecen de tubulina acetilada pero las cilias mantienen el mismo nivel de tubulina acetilada que los animales salvajes. El hecho de que en ambos organismos KO haya tejidos que aún tienen tubulina acetilada denota de que a pesar de que α -TAT1 es la principal enzima acetiltransferasa de tubulina hay otra/s enzima/s que acetilan tubulina. En efecto, se han descrito otras 3 enzimas capaces de acetilar tubulina en células de

mamíferos e *in vitro*: la subunidad del complejo elongador E1p3 (*Elongator complex protein 3*) (Creppe et al., 2009; Solinger et al., 2010), el complejo N terminal-acetiltransferasa ARD1/NAT1 (Ohkawa et al., 2008), y la histona acetil transferasa Gcn5 (Conacci-Sorrell et al., 2010; Liu et al., 2013). Estas enzimas o algunas de ellas pueden ser las responsables de estos niveles basales de tubulina acetilada detectados en los ratones *KO* para α -TAT1 (o un ortólogo de ellas en el pez cebra), aunque ello resta por ser demostrado. También puede ocurrir que acetilen tubulina en condiciones fisiológicas particulares no evaluadas en estos ratones.

En animales superiores sólo hay un gen de α -TAT1, y en ratones puntualmente, se encuentran los mayores niveles de expresión de la enzima en testículos, cerebro, pelvis renal y tracto gastrointestinal (Kim et al., 2013). *C. elegans* por otro lado posee dos ortólogos de α -TAT1, Mec-17 y α -TAT2, las cuales tienen su mayor expresión en el sistema nervioso (Shida et al., 2010). La presencia de ortólogos de α -TAT1 en diversos organismos correlaciona perfectamente con la presencia de cilias o flagelos (Shida et al., 2010), aunque la recíproca no es correcta, no todos los organismos ciliados poseen ortólogos de α -TAT1, como ser las plantas y los hongos (que además si poseen tubulina acetilada) (Akella et al., 2010).

A pesar de estar relacionada filogenéticamente con la acetiltransferasa de histonas Gcn5 la α -TAT1 difiere de esta significativamente en su estructura (Friedmann et al., 2012) y es incapaz de acetilar histonas *in vitro* (Akella et al., 2010; Shida et al., 2010).

Los microtúbulos son mejor sustrato para la α -TAT1 que la tubulina dimérica (Friedmann et al., 2012; Kalebic et al., 2013b; Matsuyama et al., 2002; Shida et al., 2010). Considerando las dimensiones del microtúbulo (25 nm de diámetro externo y generalmente varias micras de largo) y el hecho de que la Lys⁴⁰ se encuentra en el lumen del microtúbulo es enigmático cómo es accede esta enzima al lumen del microtúbulo. Varias hipótesis tratan de explicarlo, aunque ninguna ha sido comprobada: una posibilidad es que entre al microtúbulo a través de los poros que hay entre dímero y dímero (contacto lateral). Sin embargo esto parece ser poco probable ya que de acuerdo a estudios de cristalografía de la enzima, la misma sería demasiado grande como para difundir a través de los poros (Friedmann et al., 2012; Taschner et al., 2012). Otra posibilidad es que entre por los extremos del microtúbulo. Consistente con esta hipótesis son los resultados de dos estudios, uno *in vitro* en donde se observó que microtúbulos de axonema en presencia de α -TAT1 se acetilan primero en los extremos (Akella et al., 2010) y otro en células espermáticas de mosca en donde también observan que la acetilación se da sobre microtúbulos y comienza en los extremos de los mismos (Wilson y Forer, 1989). Otras hipótesis es que copolimeriza con la tubulina y la última hipótesis que se postula es que la enzima entra por aperturas transientes que se pueden dar entre los protofilamentos o defectos de cierre del microtúbulo (Díaz et al., 2003).

Es muy importante destacar que la α -TAT1 tiene otras funciones que son independientes de la acetilación de tubulina. Una de ellas es la acetilación de otras proteínas: al día de la fecha las únicas proteínas que se han descrito (además de tubulina) son la propia α -TAT1 (Kalebic et al., 2013b) y cortactina, una proteína nucleadora y ramificadora de microfilamentos (Castro-Castro et al., 2012). Sin embargo, hace poco tiempo que se ha descubierto la α -TAT1 y no son muchos los trabajos que la estudian, por lo que potencialmente puede haber un número sustancialmente mayor de proteínas acetilables por esta enzima.

Por otro lado tiene funciones que son independientes de su actividad catalítica. En el nemátodo *C. elegans* Mec-17 (ortólogo de α -TAT1) se expresa solamente, pero gran cantidad, en

sus 6 neuronas sensibles al tacto (TRNs, *Touch receptor neurons*). Mutaciones en el gen de Mec-17, o la ausencia de la proteína, producen en la vida adulta del organismo una degeneración axonal de las TRNs que culmina en la pérdida del tacto. Este fenotipo es independiente del grado de acetilación de la tubulina ya que el mismo varía muy poco por la ausencia de Mec-17 (debido a la presencia en esas mismas neuronas del parólogo de Mec-17, la α -TAT2). Además, el fenotipo se rescata si se introduce una versión de Mec-17 que es inactiva catalíticamente y por ende carece de la capacidad de acetilar tubulina (Neumann y Hilliard, 2014; Topalidou et al., 2012). También se describió que la α -TAT1 puede desestabilizar los microtúbulos de manera independiente a la actividad catalítica de la misma: la sobreexpresión de α -TAT1 en células NIH 3T3, así como la de una mutante catalíticamente inactiva, desestabilizan los microtúbulos (Kalebic et al., 2013b). En sintonía con este experimento, otro grupo de investigación determinó mediante experimentos *in vitro* utilizando proteínas purificadas que la α -TAT1 puede unirse al microtúbulo por la pared externa del mismo (no en el lumen donde se encuentra la Lys⁴⁰), a través del extremo C-terminal de tubulina, y que su unión provoca defectos en el cierre del microtúbulo y consecuentemente la desestabilización de los mismos (Howes et al., 2014).

Deacetilasas: HDAC6, y otras

HDAC6 (*Histone Deacetylase 6*), una proteína que pertenece al grupo de las histonas deacetilasas clase IIb (Grozingler et al., 1999; Verdin et al., 2003), es la principal encargada de deacetilar tubulina en animales. Tiene la capacidad de deacetilar tubulina *in vitro* y, a juzgar por los aumentos de tubulina acetilada tras la inhibición o bloqueo de su expresión, es la principal deacetilasa tanto en líneas celulares humanas (Bertos et al., 2004; Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003) como en la mayoría de los tejidos de ratón: sistema nervioso central y periférico (Bobrowska et al., 2011; Fukada et al., 2012; Taes et al., 2013), corazón, riñón, hígado, bazo, testículos y fibroblastos embrionarios (Gao et al., 2007; Zhang et al., 2008). Se encuentra expresada en la mayoría de los órganos aunque su mayor expresión se da en testículos (ver tabla I).

En cuanto a su localización subcelular HDAC6 posee tanto dominios de exportación como de importación nuclear. De esta manera HDAC6 transloca entre el núcleo y el citoplasma y, bajo condiciones fisiológicas normales, se encuentra principalmente en el citoplasma (Bertos et al., 2004). Sin embargo, en ciertos tipos celulares poco diferenciados como células cancerosas, células madre nerviosas u osteoblastos en proceso de diferenciación, así como en células diferenciadas pero en condiciones particulares (arresto de la proliferación celular) HDAC6 puede aumentar notablemente su presencia en el núcleo (Chen et al., 2013; Verdel et al., 2000; Westendorf et al., 2002). En el citoplasma esta deacetilasa colocaliza con microtúbulos (Asthana et al., 2013; Haggarty et al., 2003; Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003), a través de la unión directa con β -tubulina (Zhang et al., 2003). De hecho la unión entre ambas proteínas es suficientemente fuerte como para encontrar HDAC6 en la fracción de las MAPs en muestras de tubulina purificadas por ciclado de microtúbulos (ver métodos de purificación más adelante) (Haggarty et al., 2003).

HDAC6 no requiere de terceras proteínas para deacetilar tubulina (Zhao et al., 2010b) e *in vitro* puede deacetilar tanto tubulina dimérica como microtúbulos (Hubbert et al., 2002; North

et al., 2003; Zhao et al., 2010b), aunque hay discrepancia en la literatura sobre cuál es mejor sustrato: según Hubbert *et al* sólo deacetila microtúbulos, según North *et al* deacetila ambos y según Zhao et al deacetila ambos pero es mejor sustrato la tubulina dimérica. En células en cultivo la tubulina dimérica es muy buen sustrato para la HDAC6 (Matsuyama et al., 2002).

La actividad deacetilasa de HDAC6 puede ser regulada tanto a través de modificaciones postraducción como a través de la unión a otras proteínas (ver tablas II y III respectivamente).

La sirtuina 2 o Sirt2, una histona deacetilasa del grupo III, también puede deacetilar tubulina tanto *in vitro* como en células en cultivo (Li et al., 2007; North et al., 2003; Pandithage et al., 2008). Sin embargo, su rol como deacetilasa de tubulina en el organismo (al menos en mamíferos) queda en duda dado que, a diferencia de lo que sucede con la HDAC6, en animales *KO* de Sirt2 no se observa un aumento en los niveles de tubulina acetilada ni en sistema nervioso (Beirowski et al., 2011; Bobrowska et al., 2012; Taes et al., 2013), ni en el resto de los tejidos (Kim et al., 2011).

Al igual que con las acetiltransferasas diferentes de α -TAT1, Sirt2 podría deacetilar tubulina en condiciones fisiológicas particulares diferentes de las condiciones estándar de laboratorio o durante algún momento del desarrollo en particular. Esto resta por ser demostrado.

Una tercera proteína, la HDAC5, ha sido propuesta como una tubulina (Cho y Cavalli, 2012). Esta histona deacetilasa es de localización principalmente nuclear pero, según se describe en el trabajo de Cho y Cavalli, en neuronas periféricas de ratón, tras una lesión del axón (nervio) la misma transloca fuera del núcleo y migra hasta la punta del axón (cerca de la lesión) donde deacetila tubulina junto con HDAC6. No se ha descrito ninguna otra condición en donde HDAC5 promueva la deacetilación de tubulina.

Tabla I: Distribución tisular de HDAC6

Organismo analizado	Técnica utilizada	Tejidos de mayor abundancia	Referencia
Ratón	Extracción de tejido y Western blot	Testículo, en menor medida cerebro	Bobrowska et al., 2011
		Testículo	Seigneurin-Berny et al., 2001
		Testículo, en menor medida cerebro e hígado	Zhang et al., 2008
	Inmuno-histología	Núcleos raphe medio y dorsal (sólo analizan cerebro)	Fukada et al., 2012
		Cerebelo: en especial células de Purkinje, ausente en células gliales (sólo analizan Sist. Nerv. Ctral.)	Southwood et al., 2007
	Extracción de tejidos y Northern blot	Testículos, en menor medida hígado, y en menor medida cerebro y corazón	Verdel y Khochbin, 1999
Humano		Corazón, hígado riñón y páncreas	Grozinger et al., 1999
Rata (machos)	Hibridización <i>in situ</i> de alta resolución	Se encuentra en todo el cerebro, con mayor abundancia en corteza, bulbo olfatorio e hipocampo (sólo analizan cerebro)	Broide et al., 2007

Tabla II: Modulación de la actividad catalítica de HDAC6 mediante modificaciones postraduccion

Modificación postraduccion	Enzima que lleva a cabo esa modificación	Efecto sobre actividad deacetilasa de HDAC6	Referencia
Acetilación de lisina	p300 (coactivador transcripcional)	Inhibición	Han et al., 2009; Liu et al., 2012
Fosforilación de serina 22	GSK3 β (<i>Glycogen Synthase Kinase 3b</i>)		Chen et al., 2010
Fosforilación	Aurora A	Activación	Pugacheva et al., 2007
Fosforilación	PKC α (<i>Protein Kinase C alfa</i>)		Zhu et al., 2011

Tabla III: Modulación de la actividad catalítica de HDAC6 mediante unión a proteínas

Proteína	Efecto sobre actividad deacetilasa de HDAC6	Mecanismo de activación/inhibición planteado	Referencia
mDia2 (efector de Rho)	Activación	Unión directa	Destaing et al., 2005
Farnesiltransferasa		Unión en complejo con los microtúbulos	Zhao et al., 2010a
Receptor de estrógeno ligado a membrana plasmática		Unión directa	Azuma et al., 2004
Septina		Unión en complejo con los microtúbulos	Ageta-Ishihara et al., 2013
tau (MAP clásica)	Inhibición	Unión directa	Perez et al., 2009
TPPP/P25 (estabilizadora de microtúbulos)			Tokési
CYLD (Prot. Desubiquitinadora)		Unión directa y estabilización de microtúbulos	Wickström et al., 2010
Dysfelrin (proteína transmembrana de células musculares)			Di Fulvio et al., 2011
CHIP (<i>carboxy terminus of Hsp70-interacting protein</i>), proteína ubiquitín-ligasa		Ubiquitina HDAC6 y disminuye los niveles de proteína	Cook et al., 2012



Funciones de HDAC6 no relacionadas a la deacetilación de tubulina

La HDAC6 cumple otras funciones muy importantes aparte que deacetilar tubulina. Estas funciones no pueden dejar de mencionarse ya que son clave a la hora de interpretar experimentos (relacionados al rol de la acetilación) en donde se modifica la actividad o cantidad de la enzima. Estas funciones incluyen la interacción de la HDAC6 inhibida con microtúbulos y con ello la estabilización de los mismos (aunque los resultados en literatura no son homogéneos, ver detalles más adelante), la deacetilación de otras proteínas (ver tabla IV), la interacción con y modulación de otras proteínas (independientemente de su actividad deacetilasa, ver tabla V) y funciones relacionadas a la eliminación de proteínas mal plegadas.

En cuanto a la interacción y estabilización de microtúbulos a través de la enzima inhibida por un lado dos grupos diferentes han descrito que la presencia de la HDAC6 catalíticamente inactiva en células (por inhibición química o por transfección de las células con una mutante catalíticamente inactiva) conlleva a una disminución del dinamismo de los microtúbulos (menor velocidad de crecimiento, más tiempo en pausa durante el crecimiento, mayor resistencia a la depolimerización por drogas y por frío), efecto que es independiente del estado de acetilación de la tubulina ya que no se observa en las células *KO* de HDAC6 (Asthana et al., 2013; Zilberman et al., 2009). Resultados similares fueron observados en otros dos trabajos utilizando como única estrategia experimental el tratamiento de las células con inhibidores químicos de la HDAC6 (Matsuyama et al., 2002; Tran et al., 2007). En estos trabajos no se puede descartar que sea el aumento de tubulina acetilada la razón de la mayor estabilidad de los microtúbulos. Por otro lado en otros 3 trabajos de grupos independientes observan que la inhibición química de HDAC6 en células en cultivo no confiere a los microtúbulos una mayor resistencia a la depolimerización (Haggarty et al., 2003; Palazzo et al., 2003; Tokési et al., 2010). En otro trabajo, de otro grupo de investigación, tratan células con un paninhibidor de deacetilasas y no detectan un cambio en la tasa de crecimiento ni acortamiento de los microtúbulos (Matov et al., 2010). En pocas palabras, no está claro si la mera presencia de la HDAC6 inhibida puede influenciar el dinamismo de los microtúbulos.

Como se mencionó anteriormente HDAC6 también participa de la eliminación de proteínas mal plegadas. Por un lado, a través de un dominio llamado ZnF-UBP (*zinc-finger ubiquitin binding domain*), la HDAC6 puede unir cadenas de mono o poliubiquitina (Boyault et al., 2006; Hook et al., 2002; Seigneurin-Berny et al., 2001) y por otro puede unir el motor molecular dineína, el cual se mueve hacia el extremo menos de los microtúbulos. De esta manera la HDAC6 participa del transporte de estas proteínas hacia el agregosoma (Kawaguchi et al., 2003). El agregosoma es un cuerpo de inclusión de localización yuxtannuclear que se forma cuando hay un exceso de proteínas mal plegadas en la célula (por ejemplo cuando se inhibe el proteosoma). También participa del proceso de macroautofagia mediando el transporte de lisosomas hacia la región pericentriolar (a través de un mecanismo no descrito) (Iwata et al., 2005).

Tabla IV: Proteínas deacetiladas por HDAC6

Nombre	Función	Efecto de su deacetilación	Referencias
HSP90	Chaperona	Activación	Aoyagi y Archer, 2005; Bali et al., 2005; Kovacs et al., 2005
Cortactina	Estabiliza y nuclea microfilamentos		Kaluza et al., 2011; Zhang et al., 2007
Peroxiredoxina	Regula el estado rédox de la célula	Disminución de su capacidad reductora y su resistencia a la superoxidación	Parmigiani et al., 2008
β-catenina	Efeotor de Wnt	Promoción de su translocación al núcleo	Li et al., 2008; Zhu et al., 2011
Ku70	Factor nuclear	Promoción de la liberación de Bax por parte de Ku70	Subramanian et al., 2011
Survivina	Proteína oncogénica	La deacetila y con eso regula su importación nuclear	Riolo et al., 2012
TRIM50	Ubiquitín-ligasa E3	Regula la degradación de TRIM50	Fusco et al., 2014
Tat	Proteína del V.I.H. (Virus de Inmunodeficiencia Humano)	La deacetila y con eso activa la transcripción del virus	Huo et al., 2011

Tabla V: Proteínas que interaccionan con HDAC6 pero no son deacetiladas por ella

Nombre	Función	Efecto de la unión de HDAC6	Referencias
RunX2	Factor de transcripción	Regulación de su actividad como factor de transcripción	Ozaki et al., 2013
NF-κβ	Factor de transcripción		Zhang y Kone, 2002
Tip60-p400	Complejo acetiltransferasa de histonas	Promoción de la unión del complejo a sus genes blanco en células madre embrionarias	Chen et al., 2013
Tau	MAP estabilizadora de microtúbulos	Promoción de la fosforilación de Tau	Ding et al., 2008

Rol fisiológico de la acetilación de tubulina

Básicamente hay dos maneras (complementarias entre ellas) de estudiar el rol de la acetilación de tubulina: una es *in vitro*, haciendo ensayos bioquímicos con elementos purificados y caracterizados y la otra es *in vivo* (término que aquí se utiliza para referirse a células en cultivo, tejidos organotípicos u organismos completos). *In vivo*, a su vez, se pueden utilizar dos enfoques. Uno es modificar la actividad o expresión (y con ello la actividad) de una u otra enzima involucradas en la acetilación y deacetilación de tubulina. Otra estrategia que se utilizó en experimentos con células en cultivo es la de expresar en las células una mutante de α -tubulina en la cual se reemplazó la lisina 40 por un aminoácido que imita la lisina sin acetilar (mutación K40R) o la lisina acetilada (K40Q), pero que no pueden ser modificadas por las enzimas acetiltransferasas o deacetilasas respectivamente.

En cuanto a los ensayos *in vitro*, si uno quiere estudiar qué diferencia produce el hecho de que la tubulina/microtúbulo se encuentre acetilado es necesario tener una preparación que contenga principalmente tubulina acetilada y otra que contenga principalmente tubulina deacetilada, para comparar. Además, idealmente, ambas preparaciones deberían diferir sólo en el grado de acetilación de la tubulina y ser análogas en el resto de las variables (grado de pureza de la tubulina, e identidad de las potenciales impurezas, presencia de otras modificaciones postraduccionales sobre la tubulina, etc.). En estudios previos a la identificación de la enzima acetiltransferasa (finales del año 2010) esto era muy difícil ya que las preparaciones de tubulina purificada contienen muy poca cantidad de tubulina acetilada (Kim, 1991; Sale et al., 1988), y si bien en un estudio de la época se describía un protocolo para acetilar tubulina *in vitro* (Maruta et al., 1986), el mismo rara vez fue utilizado por otros grupos. Posterior a la identificación de la enzima acetiltransferasa esto se hizo más accesible ya que la enzima se puede expresar recombinantemente en bacterias y ser utilizada en ensayos *in vitro* para acetilar tubulina. Sin embargo, dado el poco tiempo transcurrido desde entonces (4 años) y sumado al hecho de que obtener la proteína recombinante y purificarla cuesta considerable cantidad de tiempo y dinero, esta técnica ha sido utilizada en muy pocos trabajos. Alternativamente, algunos grupos de investigación han optado por utilizar un oligopéptido sintetizado químicamente cuya secuencia es la de α -tubulina conteniendo la Lys⁴⁰ acetilada o no y sus aminoácidos más cercanos, pero este enfoque tiene serias limitaciones. De cualquier manera, y para resumir, han sido muy pocos los trabajos donde hayan hecho estudios bioquímicos comparativos entre tubulina acetilada y no acetilada, y menos aún aquellos que han utilizado preparaciones "ideales" (que sólo difieran en el grado de acetilación de tubulina).

Por otro lado, los experimentos *in vivo* en donde se estudia el rol de la acetilación de tubulina son mucho más abundantes pero su interpretación es por lejos más complicada. Esto se debe principalmente al hecho de que ambas enzimas (α -TAT1 y HDAC6) tienen efectos y funciones independientes de su actividad catalítica sobre tubulina: α -TAT1 acetila cortactina, tiene un efecto desestabilizante de microtúbulos y además, a través de un mecanismo desconocido pero independiente de la acetilación de tubulina, es necesaria para la correcta función de ciertas neuronas en *C. elegans*. El hecho de desconocer este mecanismo hace que cualquier conexión causal que se quiera establecer entre un fenotipo generado por un cambio en el nivel de α -TAT1 y la acetilación de tubulina sea más incierto, ya que potencialmente puede ser explicado por este mecanismo incierto. HDAC6 por su parte deacetila, y de esta manera regula la actividad de al menos 6 proteínas diferentes de tubulina. Estas proteínas además difieren mucho

en su naturaleza y las funciones que cumplen en la célula, lo que amplía el repertorio de fenotipos que pueden resultar de la inhibición de la HDAC6 (independientes de la acetilación de tubulina). Más aún, una de esas proteínas es cortactina, la cual regula la nucleación de microfilamentos, los cuales a su vez participan de muchos procesos conjuntamente con los microtúbulos, haciendo la interpretación causal de los fenotipos generados por la inhibición o sobreexpresión de la HDAC6 aún más complicada. HDAC6 también se une a y regula la actividad de factores nucleares y al menos una histona acetiltransferasa, y está muy ligada a los procesos autofágicos y de eliminación de proteínas mal plegadas.

En resumidas cuentas el o los roles fisiológicos de la acetilación de tubulina no están claros y no hay un consenso en la comunidad científica al respecto. A continuación un repaso sobre los principales estudios y proposiciones hechas al respecto. Primero se describen los roles planteados para la acetilación de tubulina a nivel molecular, luego a nivel celular y por último a nivel organismo.

A nivel molecular se le han asignado varias funciones a la acetilación de tubulina. Históricamente se la asoció con una mayor estabilidad de los microtúbulos y existe una fuerte correlación entre microtúbulos estables y acetilados. Sin embargo no se pudo demostrar fehacientemente si la acetilación le infiere estabilidad a los microtúbulos, ya sea per se, o a través de una tercera proteína. La evidencia hasta el día de la fecha es más sugestiva de que los microtúbulos se acetilan porque son estables y no al revés (aunque ambas proposiciones no son excluyentes). En estudios *in vitro* se observó que tubulina purificada sometida a una acetilación enzimática (utilizando un extracto flagelar de *Chlamydomonas*), tiene la misma capacidad de polimerización y depolimerización (ante el frío y nocodazol) que aquella que no fue acetilada enzimáticamente (Maruta et al., 1986). Estudios posteriores determinaron que la cinética de polimerización de tubulina purificada acetilada o deacetilada (utilizando las enzimas α -TAT-1 y Sirt2 respectivamente) son indistinguibles (Soppina et al., 2012). Además, estudios estructurales de microtúbulos altamente acetilados o altamente deacetilados (a través de la incubación con α -TAT1 o Sirt2 recombinantes) utilizando crio-electromicroscopía no detectan ninguna diferencia en la arquitectura de los mismos (Howes et al., 2014; Soppina et al., 2012). En varios estudios se observó que tras el tratamiento de células con inhibidores de HDAC6 el nivel de tubulina acetilada aumenta pero el dinamismo de los microtúbulos no varía (Haggarty et al., 2003; Matov et al., 2010; Palazzo et al., 2003; Tokési et al., 2010), con lo que se infirió que la acetilación de microtúbulos *in vivo* no estabiliza los microtúbulos. Experimentos en donde se modifican los niveles de tubulina acetilada suprimiendo la expresión de la HDAC6 o la α -TAT1 en líneas celulares tampoco ven diferencia en la estabilidad de los microtúbulos (Shida et al., 2010; Zhang et al., 2008) o inclusive ven una correlación inversa a la esperada (menos acetilación, más estabilidad) (Kalebic et al., 2013a). Sin embargo, una objeción común a todos estos experimentos en células es que se basaron en cambios relativos en los niveles de tubulina acetilada, y no determinaron qué porcentaje de la tubulina se encontraba acetilada antes y después del tratamiento. De haber un efecto umbral, es posible que tras modificar los niveles de acetilación no se observe estabilización/desestabilización de los microtúbulos dado que no se ha superado esa concentración crítica (de tubulina acetilada) en donde se observa el fenómeno de estabilización. Otra evidencia de que los microtúbulos se acetilan porque son estables es que la estabilización de microtúbulos por agentes químicos (por ejemplo taxol) generalmente es acompañada de un aumento en los niveles de tubulina acetilada (Hammond et al., 2010; Piperno et al., 1987).

En la mayoría de los organismos los microtúbulos están compuestos por 13 protofilamentos. Sin embargo en *C. elegans* los microtúbulos están compuestos por 11 protofilamentos en todas las células, menos en las neuronas sensibles al tacto, en donde tienen 15 protofilamentos. Estos microtúbulos de mayor diámetro sólo se forman cuando hay tubulina acetilada (Cueva et al., 2012; Topalidou et al., 2012). Aparentemente, esto no es consecuencia de la acetilación per se, sino de la interacción de microtúbulos con otra proteína presente en *C. elegans* ya que microtúbulos polimerizados *in vitro* utilizando tubulina pura altamente acetilada o altamente deacetilada tienen el mismo número de protofilamentos (Howes et al., 2014; Soppina et al., 2012).

Aparte de potencialmente estabilizar los microtúbulos y alterar el número de protofilamentos que componen un microtúbulo *in vivo*, se ha determinado que la acetilación de tubulina es un requisito para la interacción de tubulina/microtúbulos con otras proteínas. En nuestro laboratorio y el de colaboradores se determinó que 3 bombas de iones de membrana plasmática del grupo de las P-ATPasas (la Na⁺/K⁺-ATPasa, la Ca²⁺-ATPasa y la H⁺-ATPasa en levaduras) interactúan específicamente con tubulina acetilada, y que esa interacción inhibe la actividad catalítica de las bombas (Campetelli et al., 2005; Casale et al., 2001, 2001; Monesterolo et al., 2008; Santander et al., 2006). Por otro lado, a partir de estudios en células en cultivo (sin ensayos *in vitro*) se propuso que microtúbulos acetilados son más propensos a ser cortados por la enzima katanina (Sudo y Baas, 2010). El modelo actual propuesto para el mecanismo de corte de microtúbulos por katanina plantea que estas enzimas tiran del dominio C-terminal de tubulina (el cual protruye hacia afuera del microtúbulo) y de esta manera desnaturalizan parcialmente la tubulina, desestabilizando los contactos entre dímeros y así pudiendo cortar el microtúbulo (Roll-Mecak y McNally, 2010; Sharp y Ross, 2012). Dado que la lisina 40 se encuentra en el lado luminal del microtúbulo, es difícil concebir como la katanina puede reconocer esta modificación postraduccional estando fuera del microtúbulo, sobre todo si consideramos que las estructuras de microtúbulos acetilados y no acetilados (en ausencia de terceras proteínas) son indistinguibles (Howes et al., 2014; Soppina et al., 2012). Otra proteína que se ha reportado que se asocia preferentemente con microtúbulos acetilados es el motor molecular kinesina-1. Sin embargo resultados de diferentes grupos son contradictorios. Por un lado, Reed *et al* (2006) a través ensayos con células en cultivo tratadas o no con tubacina (un inhibidor específico de la HDAC6 (Haggarty et al., 2003)) determinan que la localización de kinesina-1 siempre correlaciona con la de los microtúbulos acetilados. A esto le suman experimentos bioquímicos con tubulina semi-purificada conteniendo mutaciones en la lisina 40 que imitan la lisina no acetilada (K40R) o tubulina extraída (sin mayor purificación) de células tratadas con tubacina con los que determinan que la kinesina-1 se une más y camina más rápido sobre microtúbulos acetilados que sobre microtúbulos no acetilados. Otros dos grupos obtienen resultados similares con técnicas similares (Dompierre et al., 2007; Konishi y Setou, 2009). Sin embargo, otro estudio en donde utilizan la misma estrategia que en el trabajo de Reed *et al*, pero utilizando células levemente diferentes (neuronas de hipocampo en estadio II o III en uno y otro estudio) no logra reproducir los resultados. Más tarde, dos grupos diferentes, utilizando tubulina purificada y acetilada o deacetilada *in vitro* utilizando las respectivas enzimas (α -TAT1 y la HDAC6) determinan que tanto la capacidad de unión como la velocidad de movimiento de la kinesina-1 es la misma tanto en microtúbulos acetilados como no acetilados (Soppina et al., 2012; Walter et al., 2012). Queda claro con estos experimentos que no es la acetilación *per se* la que aumenta la unión y velocidad de movimiento de la kinesina-1 a microtúbulos. Lo que no se puede discernir todavía es si la

acetilación a través de una tercera proteína (una MAP que reconozca la acetilación por ejemplo, o la misma HDAC6) promueve la unión de la kinesina-1 o si de hecho no hay relación causal entre la acetilación y la velocidad de movimiento de kinesina-1 en las células. Por último, estudios de coimmunoprecipitación determinaron que dímeros de tubulina deacetilada, pero no acetilada, se unen a la GTPasa pequeña Rheb (proteína homóloga de Ras enriquecida en cerebro) promoviendo su activación (Lee et al., 2013).

Si es difícil conectar causalmente la acetilación con algún efecto a nivel molecular, más aún lo es a nivel celular ya que aumentan considerablemente las variables. A continuación se resumen las funciones propuestas para la acetilación consideradas más relevantes a juzgar por la batería de métodos que se utilizaron para conectar la acetilación de tubulina con el fenotipo descrito. Muchos estudios no se mencionan ya que sólo consisten en la manipulación de una de las enzimas involucradas en la acetilación de tubulina (principalmente de HDAC6 para la cual existen inhibidores químicos y además se conoce desde hace más tiempo que la α -TAT1).

Las cilias primarias son organelas que consisten de una pequeña proyección hacia el exterior del cuerpo celular formadas por un axonema rodeado de membrana plasmática especializada. No son móviles y su principal función es la de censar condiciones del medio extracelular. El ensamble de esta organela está ligada a la diferenciación celular, estando ausentes en células en activa división y presentes en prácticamente todas las células de mamíferos diferenciadas (Berbari et al., 2009). La acetilación de tubulina está relacionada al ensamble y desensamble de estas organelas. En líneas celulares humanas de retina la ausencia de α -TAT1 retrasa (pero no impide) la aparición de la cilia cuando a las células se les retira el suero del medio de cultivo (condición ciliogénica) (Shida et al., 2010). La inhibición de HDAC6 por otra parte inhibe la resorción ciliar tras el agregado de suero al medio de cultivo (Pugacheva et al., 2007). El hecho de que la manipulación de ambas enzimas de resultados similares apoya el hecho de que efectivamente es la acetilación de tubulina, o algún sustrato en común (como la cortactina por ejemplo), el efector de los fenotipos observados.

Otra función a la que se ha ligado la acetilación de tubulina en varios trabajos es a la migración celular. En fibroblastos la sobreexpresión de HDAC6 aumenta la velocidad de quimiotaxis de los mismos (Hubbert et al., 2002). Estudios en embriones de rata indican que una disminución de la acetilación de tubulina, por la inhibición de la expresión de las tubulina acetiltransferasas E1p3 o α -TAT-1, resultan en defectos migratorios de neuronas corticales (Creppe et al., 2009; Li et al., 2012). Sin embargo, no hay que olvidar α -TAT-1 también acetila y regula la actividad de cortactina, la cual nuclea microfilamentos, los cuales a su vez están muy relacionados (junto con los microtúbulos) a la migración celular.

Los macrófagos, como respuesta innata ante la exposición al LPS de bacterias (lipopolisacárido, componente de la membrana externa de bacterias gram negativas) liberan principalmente citoquinas proinflamatorias pero también algunas antiinflamatorias como la IL-10 (interleuquina 10), aunque en menor cantidad. Tanto la inhibición específica de HDAC6, como la sobreexpresión de α -TAT1 promueven un aumento en la liberación de IL-10. La sobreexpresión de HDAC6, el silenciamiento de α -TAT1 o la sobreexpresión de la mutante de tubulina no acetilable (K40Q) tienen los efectos contrarios. Este efecto estaría intermediado cascada abajo de la acetilación de tubulina por la fosforilación de la MAPK p38 (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Wang et al., 2014). Finalmente esto se traduce *in vivo* ya que ratones expuestos a LPS

conjuntamente con un inhibidor específico de la HDAC6 tienen mayor sobrevivencia. El hecho de que el efecto se vea manipulando una u otra enzima, o la tubulina misma, da mayor seguridad a la hora de conectar causalmente ambos fenómenos. Un efecto diferente se observa en astrocitos primarios de ratón, cuya tolerancia inducida por LPS (medida por aumento de la secreción de IL-6) es bloqueada por el suministro de tubacina (inhibidor específico de HDAC6) (Beurel, 2011).

La acetilación de tubulina también ha sido correlacionada con el proceso adipogénico. Por empezar, ratones alimentados con una dieta alta en contenido graso poseen niveles de tubulina acetilada más altos en sus adipocitos. Por otro lado, células 3T3-L1 que expresan tubulina mutante resistente a la acetilación (K40R) acumulan significativamente menos grasa que células que contienen tubulina salvaje. Así mismo, cuando estas células sobreexpresan α -TAT1 o tienen niveles menores de HDAC6 sus niveles de tubulina acetilada aumentan y el proceso de diferenciación de los adipocitos se da con mayor velocidad. Cuando expresan α -TAT1 en menor cantidad tienen un fenotipo inverso, menor cantidad de tubulina acetilada y un proceso de diferenciación más lento (Yang et al., 2013).

Por último, un análisis de los potenciales roles de la acetilación a nivel organismo a través de la examinación de los organismos modificados genéticamente. El protozooario *Tetrahymena thermophila* es un organismo unicelular que contiene abundante cantidad de cilias y en todas ellas una cantidad considerable de tubulina acetilada. Contiene un solo gen que codifica para α -tubulina y otro para α -TAT1. Células conteniendo el gen de α -tubulina con la mutación K40R (símil lisina no acetilable) no poseen fenotipo distinguible de las salvajes (morfología, tasa de crecimiento, movilidad, resistencia de los microtúbulos al nocodazol o al taxol) (Gaertig et al., 1995). Por otro lado células *KO* para la α -TAT1 presentan un leve fenotipo al crecerlas en medios con drogas depolimerizantes o polimerizantes de tubulina que es consistente con un mayor dinamismo de microtúbulos (Akella et al., 2010). Es incierto si este fenotipo es causado por la ausencia de la enzima o por una disminución de la acetilación de tubulina (o ambos). El pez *Danio rerio* presenta uno de los fenotipos más marcados entre los organismos a los cuales se le silenció o eliminó el gen de α -TAT1: cuerpo curvado, hidrocefalia, microcefalia, ojos pequeños e insensibilidad al tacto. En *C. elegans* la eliminación del gen de α -TAT1 produce microtúbulos de variado número de protofilamentos en las neuronas TRN y también pérdida de la sensibilidad al tacto, aunque es incierto si esto último tiene relación con la acetilación de tubulina ya que los resultados son dispares entre diferentes trabajos (Akella et al., 2010; Shida et al., 2010; Topalidou et al., 2012). Ratones *KO* de α -TAT1 son viables y a grandes rasgos son indistinguibles de sus hermanos salvajes a pesar de no tener niveles detectables de tubulina acetilada en la mayoría de los tejidos (Kalebic et al., 2013a; Kim et al., 2013). Según el trabajo de Kim et al estos ratones tienen una morfología (a grandes rasgos) idéntica a la del ratón, a excepción del giro dentado de hipocampo, el cual tiene una leve deformación. Sin embargo, los autores no realizan experimentos conductuales para determinar si esa deformación tiene algún efecto sobre la fisiología cerebral. En el trabajo de Kalebic et al no detectan esa deformación en el giro dentado pero si les realizan pruebas conductuales a machos de 8 semanas de edad (pruebas de memoria -laberinto en Y-, nocicepción térmica -plato caliente-, fuerza muscular y coordinación motora) y la única diferencia que encuentran entre ambos ratones es un leve aumento de la ansiedad en los ratones *KO*. En este mismo trabajo reportan que los machos *KO* tienen espermatozoides con leves deformaciones flagelares y menor movilidad, lo que resulta en una menor fertilidad de machos *KO* respecto de salvajes (tamaño promedio de camada $7,2 \pm 0,5$ y $8,9 \pm 0,5$ respectivamente).

Ratones *KO* de HDAC6 poseen un fenotipo levemente menos ansioso que sus hermanos salvajes (Fukada et al., 2012), lo que es coherente con lo encontrado por Kalebic en el *KO* de α -TAT1. Sin embargo hay que tener en cuenta que el fenotipo de los ratones *KO* de HDAC6 también puede ser explicado en parte a través de una mayor acetilación de la chaperona Hsp90 y con ello una menor activación de los receptores de glucocorticoides (Espallergues et al., 2012; Zhang et al., 2008). Los ratones *KO* de HDAC6 también poseen una ligera disminución de la densidad ósea (sólo observable hasta los 3 meses de edad) y una muy leve disminución de la respuesta inmune dependiente de células T (Zhang et al., 2008). La eliminación de HDAC6 en ratones modelo de la enfermedad de esclerosis lateral amiotrófica demora la progresión de la enfermedad (Taes et al., 2013) y en ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer mejora levemente las capacidades cognitivas de los mismos (Govindarajan et al., 2013). Sin embargo, dada la naturaleza de estas enfermedades y las funciones de HDAC6 paralelas a la deacetilación de tubulina es muy difícil determinar si hay alguna relación entre la acetilación de tubulina y estos fenotipos.

Plantas (*Arabidopsis thaliana*) a las que se le mutó la lisina 40 del gen de α -tubulina 6 por una alanina o una glutamina (pero no por una arginina) tienen un fenotipo enano con defectos tanto en la proliferación como en la expansión celular. Acordemente, los microtúbulos corticales estaban prácticamente ausentes, probablemente debido a una disminución marcada en los niveles tanto de α como de β tubulina (Xiong et al., 2013).

Purificación de tubulina

La purificación de tubulina en grandes cantidades ha sido de suma importancia en el avance de los conocimientos relacionados a los microtúbulos. El método de purificación de tubulina más utilizado hoy en día es el desarrollado por Shelanski et al en el año 1973 (referido en adelante como método tradicional de purificación de tubulina). El método se basa en 3 propiedades de los microtúbulos y la tubulina: 1) si se incuba una solución de tubulina (con ciertos cofactores) a 37 °C se induce la polimerización de microtúbulos, 2) esos microtúbulos, pero no la tubulina dimérica, son precipitables si se centrifugan a 100.000 x g y, 3) esos microtúbulos pueden ser desensamblados por la incubación a 4 °C. Lo que se hace entonces es homogenizar un cerebro (de rata, cerdo o vaca) en frío, centrifugar y colectar el sobrenadante (SN). Incubar ese SN en condiciones de polimerización, centrifugar y colectar el precipitado (donde se encuentran los microtúbulos), incubarlos en frío y centrifugar nuevamente. A la tubulina de ese sobrenadante resultante se le refiere como tubulina de 1 ciclo de purificación. El ciclo se puede repetir muchas veces más. Como ninguna otra proteína tiene la capacidad de formar estructuras precipitables en caliente y romperlas en frío, con los ciclos se purifica la tubulina. Pero, tal como se mencionó anteriormente, hay proteínas que se asocian a los microtúbulos y co-ciclan con la tubulina (MAPs). Estas proteínas no pueden ser eliminadas por ciclado y se eliminan por cromatografía de intercambio aniónico dado que la tubulina tiene un pKa ácido y las MAPs uno básico. La tubulina que se logra purificar mediante este método sin embargo contiene niveles muy bajos y a veces indetectables de tubulina acetilada (Kim, 1991; Sale et al., 1988).

Métodos alternativos para la purificación de tubulina han surgido con el tiempo aunque han tenido un bajo impacto en la comunidad científica, algunos de ellos por su complejidad

técnica (entre otras cosas) y otros porque se han descrito hace poco tiempo (Castoldi y Popov, 2003; Jang et al., 2008; Minoura et al., 2013; Shah et al., 2001; Sloboda y Belfi, 1998; Widlund et al., 2012).

PMCA

El calcio es un segundo mensajero en innumerables procesos celulares que incluyen la fertilización, contracción muscular, transcripción génica y hasta la apoptosis (Carafoli, 2002). Para esto, las células deben mantener finamente regulada la concentración de calcio dentro del citosol, la cual suele estar alrededor de 100 nM. En animales superiores las principales proteínas encargadas de esta tarea son el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (principalmente en tejido nervioso), transportadores uniporte de mitocondria (Carafoli, 2010) y las P-ATPasas bomba de calcio de membrana plasmática o PMCA (*Plasma membrane calcium ATPase*), bomba de calcio de retículo endoplásmico o SERCA (*Sarco endoplasmic reticulum Calcium ATPase*) y bomba de calcio de Golgi o SPCA (*Secretory pathway calcium ATPase*). Las bombas de calcio, a diferencia del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, poseen alta afinidad por el calcio y baja capacidad de transporte. Por ende, son las principales responsables de la modulación fina de la concentración de calcio, especialmente en microdominios celulares (y no a nivel célula completa) (Lopreiato et al., 2014). La PMCA puntualmente es una proteína de masa molecular entre 125 y 140 kDa, posee 10 segmentos transmembrana que delimitan 6 dominios citosólicos, los cuales incluyen los extremos C y N terminal de la proteína. En humanos la PMCA está codificada por 4 genes, que a través del splicing alternativo dan lugar a más de 30 isoformas, las cuales tienen patrones de expresión tejido y desarrollo específicos (Strehler et al., 2007). La actividad de la PMCA puede ser regulada de varias maneras. La más estudiada de ellas es su activación por unión a calmodulina. En su estado inactivo el extremo C-terminal de la bomba funciona de “tapón” uniéndose al principal sitio catalítico de la bomba y de esta manera impidiendo su funcionamiento. Este dominio C-terminal posee un sitio de unión a calmodulina. Cuando la calmodulina (en presencia de calcio) se une a este sitio, lo suelta del sitio catalítico de la bomba y así esta se activa (Falchetto et al., 1991, 1992). La PMCA también puede ser activada por proteólisis del extremo C-terminal mediada por calpaina (James et al., 1989a), por fosforilación de serinas y treoninas mediadas por las proteína kinasas C y A (Hofmann et al., 1994; James et al., 1989b; Smallwood et al., 1988; Wang et al., 1991), dimerización de PMCA a través de sus extremos C-terminal (Benetti et al., 2011; Kosk-Kosicka y Bzdega, 1988; Vorherr et al., 1991), por fosfolípidos ácidos (Enyedi et al., 1987; Niggli et al., 1979; Ronner et al., 1977), por asociación con microfilamentos (Vanagas et al., 2013) y por etanol (Benaim et al., 1994; Monesterolo et al., 2008; Sepúlveda y Mata, 2004). La asociación de la PMCA actina G (no polimerizada, *globular*) así como a tubulina acetilada inhiben la actividad catalítica de la bomba (Monesterolo et al., 2008; Vanagas et al., 2013).

Dado que el análisis del complejo tubulina acetilada-PMCA es parte del objetivo de esta tesis se analizará el trabajo de Monesterolo *et al* en detalle donde se describe tal asociación. Este estudio fue realizado principalmente utilizando PMVs (*plasma membrane vesicles*) purificadas de cerebro de rata. Las PMVs son fracciones de membrana plasmática enriquecidas en sinaptosomas, los cuales son las terminales sinápticas de neuronas. La interacción entre tubulina y PMCA fue confirmada por coimmunoprecipitación de ambas moléculas y mediante este mismo método se

determinó que tanto el tratamiento de las PMVs con etanol (hasta 0,6% v/v) como con calcio/calmodulina activan la bomba al mismo tiempo que desensamblan el complejo. De particular interés son las metodologías con las que arriban a la conclusión de que la tubulina acetilada es la que forma el complejo con PMCA. Para esto lo que hacen los autores por un lado es incubar PMVs con distintas cantidades de dos preparaciones de tubulina que difieren en su porcentaje de tubulina acetilada (y quizás de otras modificaciones postraduccion también, no se chequea) y luego miden la actividad de la PMCA. Verifican que para una misma cantidad de tubulina total, el % de inhibición de la bomba se correlaciona con la cantidad de tubulina acetilada (y no tubulina total) con la que se incubó esa preparación de PMVs. Por otro lado observan que células en cultivo tratadas con TSA (*Trichostatin A*), un paninhibidor de HDACs, pero no en células no tratadas, el agregado de etanol al medio de cultivo provoca una disminución del nivel de calcio intracelular (el cual había sido aumentado previamente por el agregado de un ionóforo de calcio).

OBJETIVOS

Tomando en cuenta el estado del conocimiento sobre el rol fisiológico de la acetilación de α -tubulina en su Lys⁴⁰, las principales dificultades enfrentadas a la hora de investigar sobre este tema, tanto por la comunidad científica en general como por nuestro grupo de investigación en particular, y la línea de investigación de nuestro grupo (interacción de P-ATPasas y tubulina acetilada) se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo general

Generar herramientas y nuevos conocimientos que permitan avanzar en el entendimiento del rol fisiológico de la acetilación de α -tubulina en su Lys⁴⁰.

Objetivos específicos

- 1) Desarrollar un método simple de purificación de tubulina enriquecida en el isotipo acetilado.
- 2) Desarrollar un método simple de cuantificación del porcentaje de tubulina que se encuentra acetilada en una muestra.
- 3) Caracterizar bioquímicamente el complejo tubulina acetilada-PMCA.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE TUBULINA ENRIQUECIDA EN EL ISOTIPO ACETILADO

Los primeros pasos en el proceso de purificación de tubulina por el método tradicional (Shelanski et al., 1973) consisten en realizar un homogenato de cerebro en baño de hielo (baja temperatura para depolimerizar los microtúbulos), centrifugar (en frío también) y colectar el sobrenadante (SN₁) donde se encuentra: la tubulina dimérica proveniente de microtúbulos depolimerizados por el frío sumado a la tubulina que ya era dimérica (Fig 7A y 10A). Como se mencionó previamente, los microtúbulos estables suelen ser altamente acetilados (Ferreira y Cáceres, 1989; Lim et al., 1989; Piperno et al., 1987; Sale et al., 1988, 1988; Webster y Borisy, 1989; Wilson y Forer, 1989). Además, estaba descrito que el calcio promueve el desensamblamiento de microtúbulos estables (Berkowitz y Wolff, 1981; Karr et al., 1980; O'Brien et al., 1997; Weisenberg, 1972), con lo cual se planteó la hipótesis de que la presencia de calcio en el buffer de extracción durante el proceso de purificación de tubulina permitiría obtener mayor cantidad del isotipo acetilado en el SN₁. Esta posibilidad fue confirmada como se observa en la figura 7. Sin embargo, posteriormente, a partir observaciones casuales sobre experimentos realizados en nuestro laboratorio y tras una revisión bibliográfica (Wolf et al., 1988), se planteó la hipótesis alternativa de que el fenómeno observado (mayor contenido de tubulina acetilada en SN₁ obtenido en presencia de calcio) se pudiera deber principalmente a que el calcio estuviera inhibiendo una enzima deacetilasa de tubulina (que actuara preferentemente sobre tubulina dimérica) más que a la depolimerización de microtúbulos estables y acetilados. Para probar esta hipótesis, a un SN₁ obtenido en presencia de calcio se le agregó EGTA a fin de quelar el calcio y se lo incubó a 0 ó 37 °C. Como se observa en la figura 7C, tras quelar el calcio e incubar tanto a 0 °C como a 37 °C, la cantidad de tubulina acetilada (relativa a α -tubulina) disminuye rápidamente, denotando una alta actividad deacetilasa en el SN₁ y corroborando la hipótesis planteada.

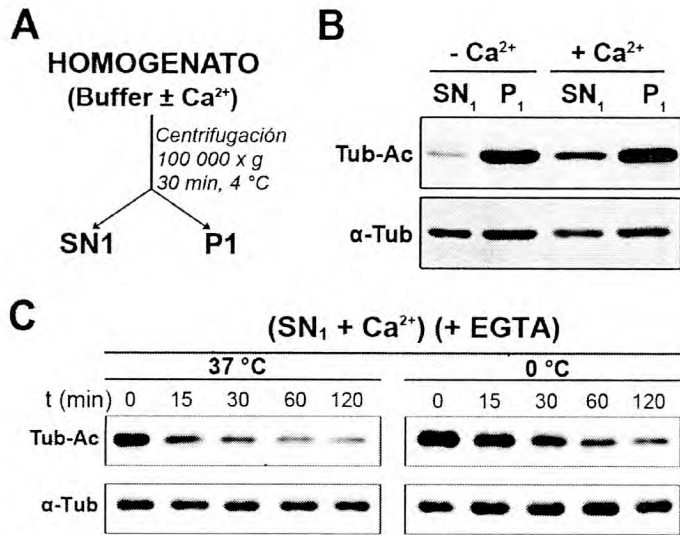
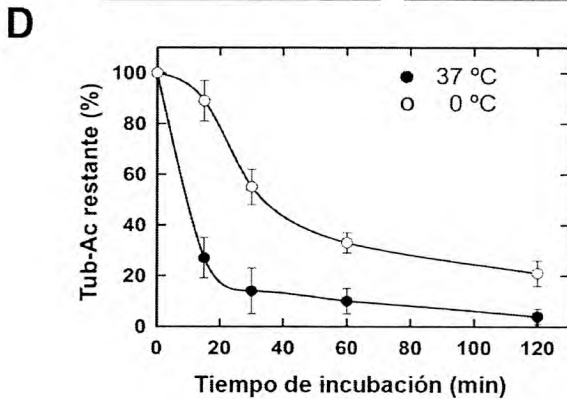


Figura 7: Presencia de actividad tubulina deacetilasa en extracto soluble de cerebro de rata

(A) Cerebros de rata fueron homogenizados en buffer en ausencia o presencia de Ca²⁺ 5mM y centrifugados a 100.000 x g a 4 °C para originar el precipitado 1 (P₁) y el sobrenadante 1 (SN₁). (B) Se analizó el contenido de tubulina acetilada (Tub-Ac) y tubulina total (α -Tub) en el SN₁ y P₁ mediante Western blot utilizando los anticuerpos monoclonales 6-11B-1 y DM1A respectivamente. (C) A un SN₁ de un homogenato obtenido en presencia de calcio se le agregó EGTA (concentración final 10 mM) y se lo incubó a 0 ó 37 °C. Se tomaron muestras a los tiempos indicados y se analizó su contenido de tubulina acetilada y tubulina total mediante Western blot. (D) Se determinaron las densidades ópticas de las bandas correspondientes a tubulina acetilada del panel B y se expresaron los valores como porcentaje respecto del valor a tiempo 0. Se muestra la media \pm D.E. de 3 experimentos.



Identificación de la enzima deacetilante de tubulina

Los resultados obtenidos indicaban que para poder obtener una preparación de tubulina purificada con la mayor cantidad de tubulina acetilada posible era necesario inhibir esa actividad deacetilasa durante el proceso de purificación. En primer lugar se pensó en usar calcio como inhibidor, sin embargo, el mismo interfiere con la polimerización de tubulina (Weisenberg, 1972), razón por la cual, para purificar tubulina altamente acetilada por el método de ensamblamiento/desensamblamiento, era necesario disponer de un compuesto que inhibiera la actividad deacetilasa de tubulina pero que no interfiriera con la polimerización o la depolimerización en frío de la misma. Para poder encontrar este inhibidor y a la vez determinar cuál era la enzima responsable de esta actividad deacetilasa se evaluó el efecto de diferentes inhibidores de deacetilasas en SN₁. Para ello se preparó un SN₁ en presencia de calcio y luego se le agregó EGTA (para quelar el calcio y así desinhibir la enzima) más el inhibidor a evaluar. Tanto TSA (Trichostatin A, un paninhibidor de deacetilasas, excepto las de clase III (Bradner et al., 2010; Grozinger et al., 2001; Yoshida et al., 1990)) como tubacina (un inhibidor específico de la HDAC6 (Haggarty et al., 2003)) inhibieron eficientemente la actividad deacetilasa (Figura 8). Por otro lado, nicotinamida (un inhibidor específico de la Sirtuina2 (Grozinger et al., 2001)) no tuvo efecto. Esto demuestra que es la HDAC6 la responsable de la deacetilación de tubulina durante el proceso de purificación, y por ende, Tubacina y TSA serían dos candidatos a utilizar durante el mismo.

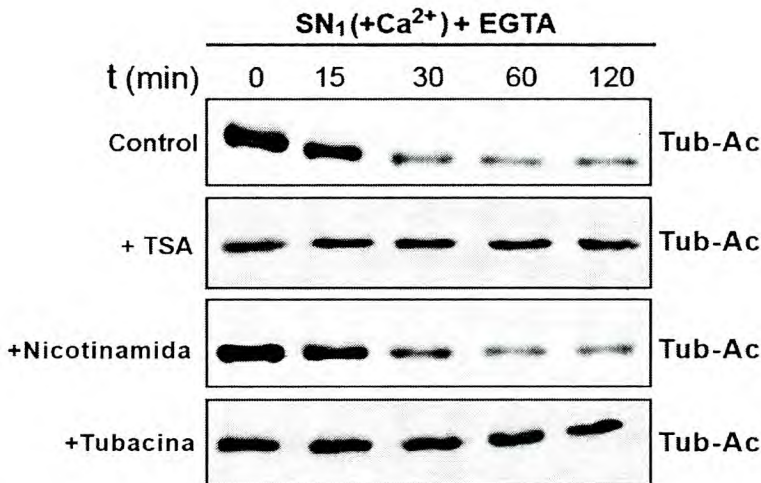


Figura 8: Identificación de la enzima deacetilante de tubulina en homogenato de cerebro de rata

Cerebros de rata fueron homogenizados en buffer con Ca²⁺ 5mM y centrifugados. Al SN₁ resultante se le agregó EGTA (concentración final 10 mM) más agua (control), o TSA 5 μM (TSA), o Nicotinamida 1 mM (+ nicotinamida) o Tubacina 5 μM, y se lo incubó a 37 °C. Alícuotas de cada muestras fueron tomadas a los tiempos indicados y se analizó su contenido de tubulina acetilada por Western blot.

Efecto del TSA sobre la polimerización y depolimerización de tubulina

El paso siguiente fue determinar si TSA afectaba o no la polimerización/depolimerización de tubulina. Antes de realizar esta determinación fue necesario saber qué concentración de TSA era efectiva tanto en homogenatos crudos como en extractos solubles. Por esta razón se realizaron ensayos de actividad deacetilasa en función de la concentración de TSA en homogenato y en SN₁. La CI₅₀ (Concentración Inhibitoria del 50%) en homogenato fue de ≈700 nM y en SN₁ de ≈150 nM (figura 9A). La determinación del efecto del TSA sobre la polimerización/depolimerización de tubulina se realizó a una concentración de TSA 1 μM. Para ello se evaluó la cinética de polimerización/depolimerización de un SN₃ en presencia o ausencia de TSA 1 μM mediante turbidimetría.

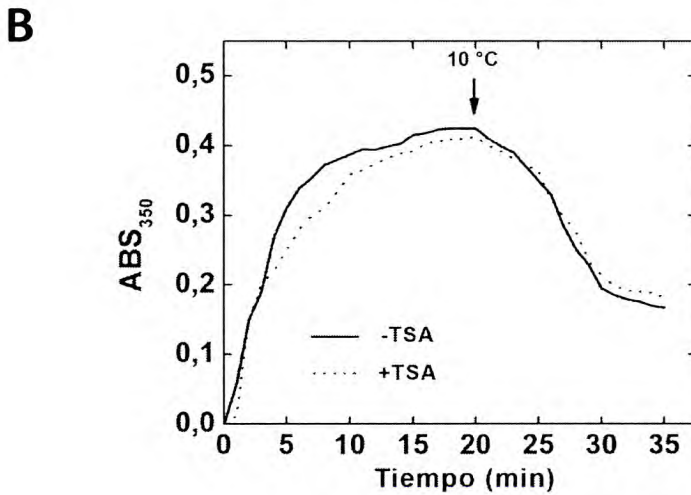
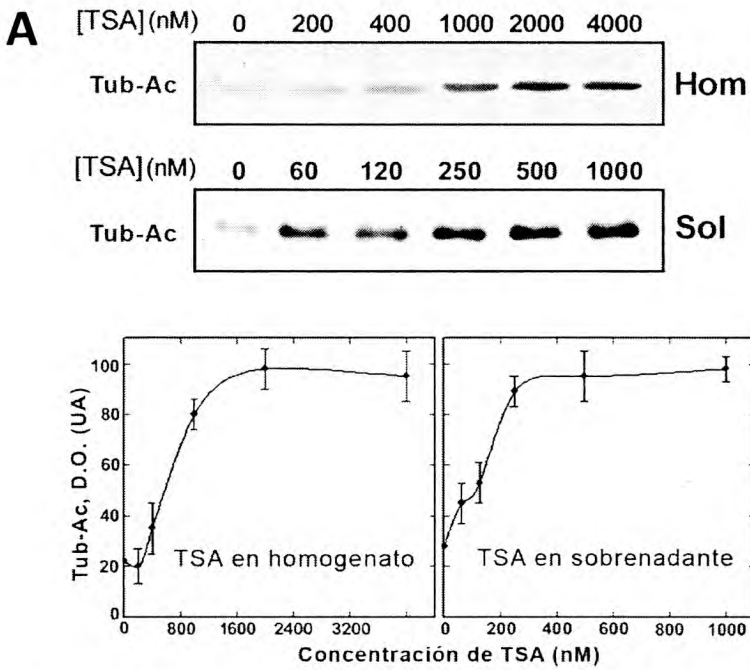


Figura 9: concentración inhibitoria efectiva de TSA en homogenato y SN₁

(A) Se obtuvieron homogenatos de cerebro de rata en ausencia de calcio y en presencia de las concentraciones de TSA indicadas. Se incubaron 30 minutos a 2-4 °C y luego se centrifugaron. Se analizó en contenido de tubulina acetilada en las fracciones sobrenadante resultantes mediante Western blot (Hom). En otro experimento, los cerebros fueron homogenizados en presencia Ca^{2+} 5 mM y centrifugados. Al SN₁ obtenido se le agregó EGTA (concentración final 10 mM) y TSA en las concentraciones indicadas. Se incubó a 37 °C por una hora y luego se analizó su contenido de tubulina acetilada por Western blot (sol). Se determinaron las densidades ópticas de las bandas de ambos experimentos y se graficaron en función de la concentración de TSA. (B) un SN₁ obtenido sin Ca^{2+} al cual se le agregó TSA 1 μ M (+TSA) o vehículo (-TSA) fue incubado en condiciones de polimerización de microtúbulos, y la formación de microtúbulos fue monitoreada mediante turbidimetría (ABS_{350}). Luego de que se alcanzó un plateau (20 minutos) se bajó la temperatura a 10 °C (flecha) para inducir la depolimerización de los microtúbulos, mientras se seguía midiendo la turbidimetría. Se muestra un experimento representativo, el cual se repitió 3 veces con resultados similares.

Como se observa en la figura 9B la presencia de TSA no afectó la polimerización (a 37°C) ni la depolimerización (en frío) de microtúbulos. TSA resulta, entonces, óptimo para el diseño de un protocolo de purificación de tubulina enriquecida en el isotipo acetilado dado que inhibe

completamente la actividad deacetilasa de la HDAC6, sin interferir con la polimerización o depolimerización de tubulina y, se encuentra disponible comercialmente a un costo accesible.

Protocolo para la purificación de tubulina enriquecida en el isotipo acetilado

Para prevenir la deacetilación de tubulina, los cerebros de rata se homogenizaron en baño de hielo en un buffer conteniendo TSA 5 μ M. En los pasos subsiguientes los buffers siempre contuvieron TSA 0,5 μ M (ver detalles en Materiales y Métodos). A lo largo del procedimiento (ver esquema en figura 10A), se tomaron muestras de homogenato y sobrenadantes 1, 3, 5, y 7 (SN₁, SN₃, SN₅ y SN₇) y se analizó su contenido de tubulina acetilada y tubulina total mediante Western Blot. Como se puede observar en la figura 10B, en las muestras obtenidas durante la purificación realizada utilizando TSA (+TSA) el contenido de tubulina acetilada respecto de tubulina total se mantuvo constante a lo largo de todo el procedimiento. En contraste, cuando el procedimiento se realizó sin TSA, el SN₁ contenía ya un nivel bajo de tubulina acetilada mientras que en el resto de los sobrenadantes era indetectable (figura 10B). Esto demuestra la eficiencia del uso de TSA como inhibidor de la HDAC6 en los procesos de purificación de tubulina.

Una vez purificada por ciclado, la tubulina enriquecida en el isotipo acetilado puede ser purificada de MAPs mediante cromatografía de intercambio aniónico (fosfocelulosa) agregando TSA 0,5 μ M en todos los buffers. El contenido de tubulina acetilada no se ve alterado tras este paso de purificación (resultado no mostrado).

Cuantificación del contenido de tubulina acetilada en preparaciones de tubulina enriquecidas o empobrecidas en dicho isotipo

Para proceder a la cuantificación del contenido de tubulina acetilada se utilizaron dos enfoques diferentes según se tratara de preparaciones enriquecidas o empobrecidas en tubulina acetilada. Para el caso de las muestras enriquecidas se comparó el nivel de acetilación de las muestras (SN₁, SN₃, SN₅ y SN₇) con el de un estándar de tubulina 100% acetilada obtenida mediante inmunoprecipitación (ver detalles en Materiales y Métodos). Para validar este estándar se realizó un control de especificidad de inmunoprecipitación utilizando como sustrato un SN₅ preparado en ausencia de TSA, el cual carece de tubulina acetilada. La inmunoprecipitación fue específica para tubulina acetilada ya que sólo se une y luego eluye α -tubulina cuando el input que se utiliza contiene tubulina acetilada (figura 11A). Por ende, se considera que el estándar contiene el 100% de las moléculas de tubulina acetiladas. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de tubulina acetilada de los diferentes sobrenadantes, siendo en promedio de 64% \pm 10% (figura 11B).

En cuanto a las muestras empobrecidas se evaluó el porcentaje de tubulina acetilada en el SN₃. Para ello se utilizó el "método de cuantificación por adición de estándar" (Bader, 1980). El estándar en este caso fue un SN₃ enriquecido, el cual contiene un 64% de la tubulina acetilada (Fig. 11A). Tras la aplicación del método, tal como está descrito en materiales y métodos, se determinó que el SN₃ empobrecido contiene un 0.2% \pm 0.1% de tubulina acetilada respecto de tubulina total (Fig. 11C y 11D).

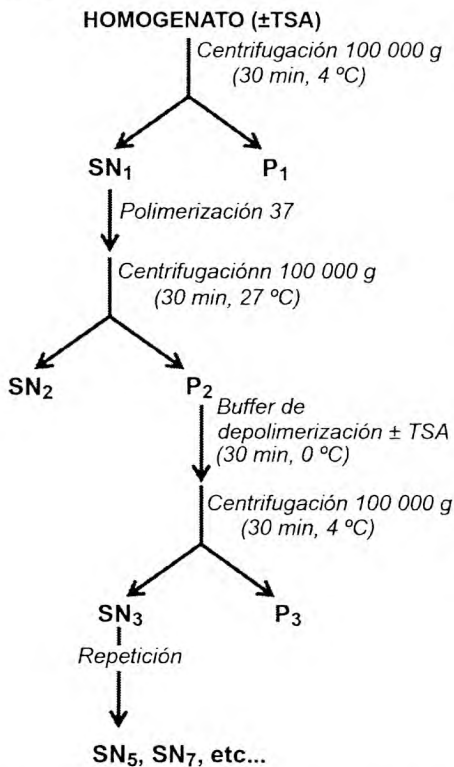
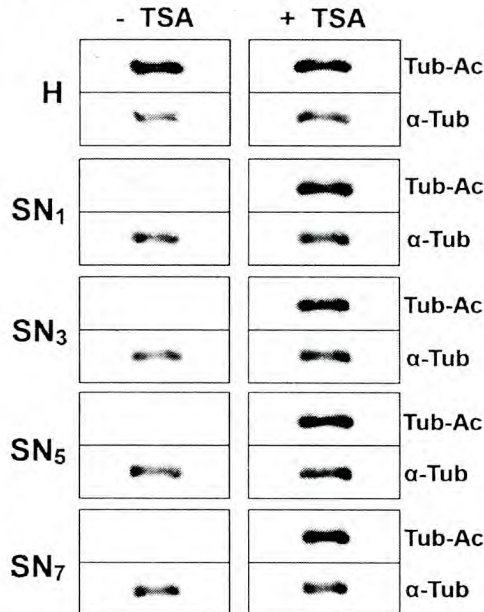
A**B**

Figura 10: protocolo de purificación de tubulina enriquecida o empobrecida en el isotipo acetilado

(A) Esquema de los protocolos de purificación de tubulina enriquecida o carente del isotipo acetilado descrito en Materiales y Métodos. La diferencia entre ambos protocolos radica en que en el primero el TSA está presente en todos los buffers usados (+TSA) mientras que en el segundo nunca está presente (-TSA). Se describen los pasos hasta la obtención de un SN₃, que corresponde a una preparación de tubulina purificada por un ciclo. Para repetir el ciclo se trata el SN₃ como si fuera un SN₁ y se prosigue usando el mismo esquema (con pequeñas variaciones, ver materiales y métodos para más detalles). (B) se tomaron muestras del homogenato (H), SN₁, SN₃, SN₅ y SN₇ y se analizó su contenido de tubulina acetilada (Tub-Ac) y tubulina total (α-Tub) por Western blot. Para poder hacer una comparación directa de los niveles de tubulina acetilada en cada paso de protocolo se sembraron cantidades iguales de α-tubulina.

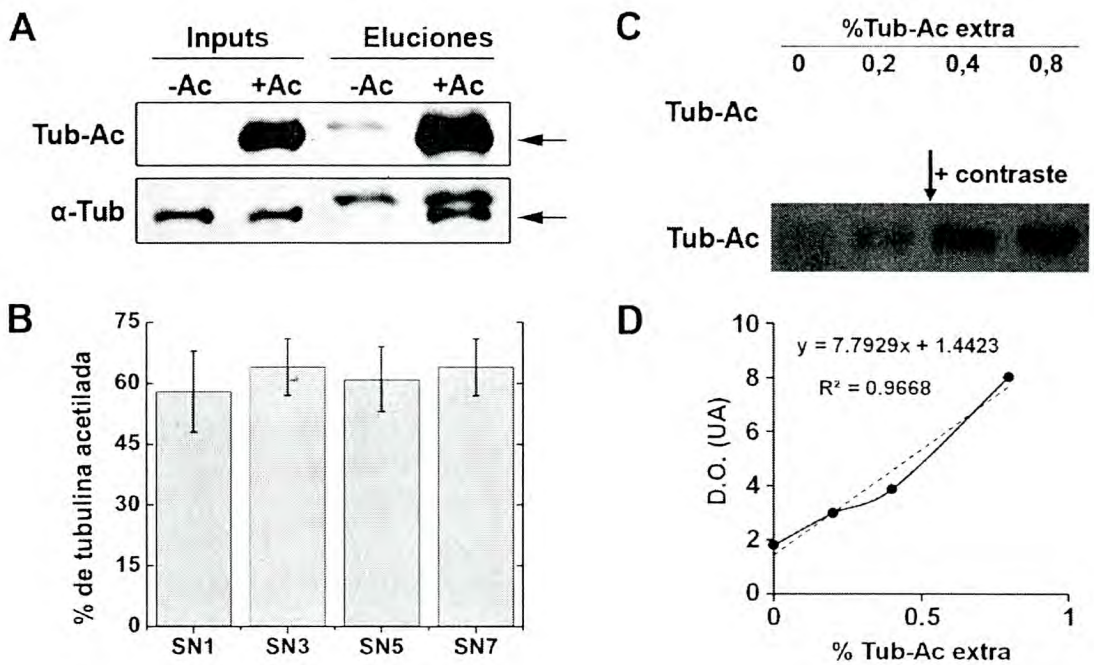


Figura 11: Cuantificación de tubulina acetilada

(A) Preparación de estándar de tubulina 100% acetilada por inmunoprecipitación. Se ligó el anticuerpo 6-11B-1 a proteína G sefarosa y se incubó con un SN₅ enriquecido en tubulina acetilada (input, +Ac), o un SN₅ empobrecido en tubulina acetilada (input, -Ac) como control negativo. Se lavaron las camas y se eluyeron las proteínas unidas mediante el agregado de buffer de siembra de SDS-PAGE. Se analizó el contenido de α-tubulina y tubulina acetilada de inputs y eluciones mediante Western blot. Con una flecha se marca la banda de tubulina, la banda superior corresponde a la cadena pesada del anticuerpo 6-11B-1 (B) Utilizando el estándar de tubulina 100% acetilada de (A) se cuantificó el porcentaje de tubulina acetilada en sobrenadante 1, 3, 5 y 7 mediante comparación por Western blot (ver materiales y métodos) (C) Utilizando un SN₃ enriquecido y un SN₃ empobrecido en tubulina acetilada se prepararon 4 mezclas que contienen 0, 0.2, 0.4 y 0.8% de tubulina acetilada extra al porcentaje que ya contiene de por sí el SN₃ empobrecido (% de Tub-Ac extra). Para ellos se consideró que el SN₃ contiene un 64% de tubulina acetilada. Se analizó el contenido de tubulina acetilada de todas las muestras por Western blot. La señal de la banda de tubulina acetilada era muy baja (membrana superior) por lo que se aumentó el contraste de la imagen para poder visualizar las bandas (membrana inferior). (D) Se cuantificaron las bandas de (B) y se graficó la densidad óptica de las bandas (OD) expresada en unidades arbitrarias (UA) en función del % de tubulina acetilada que la muestra contiene extra al que ya tiene el SN₃ empobrecido (% de Tub-Ac extra). En líneas punteadas se muestra la recta que mejor ajusta a los datos calculada por regresión lineal, la cual es descrita por la siguiente ecuación: $y = 7.79 \times X + 1.44$, con valor de $R^2 = 0.9668$ ($n=2$).

Comparación de propiedades entre preparaciones purificadas de tubulina enriquecidas o empobrecidas en el isotipo acetilado

Mediante los procedimientos ilustrados en la figura 10A se obtuvieron preparaciones de tubulina de tres ciclos (SN₇) enriquecida o empobrecida del isotipo acetilado. Estas preparaciones fueron comparadas en relación a varias propiedades. Por un lado se analizó su composición proteica mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie blue (figura 12A). Por otro lado se analizaron sus cinéticas de polimerización-depolimerización mediante turbidimetría (figura 12B). Finalmente se compararon los niveles de tubulina tirosinada, tubulina-Glu (detirosinada) y tubulina-Δ2

mediante Western blot (figura 12C). No se observó ninguna diferencia entre ambas preparaciones en ninguno de los aspectos evaluados.

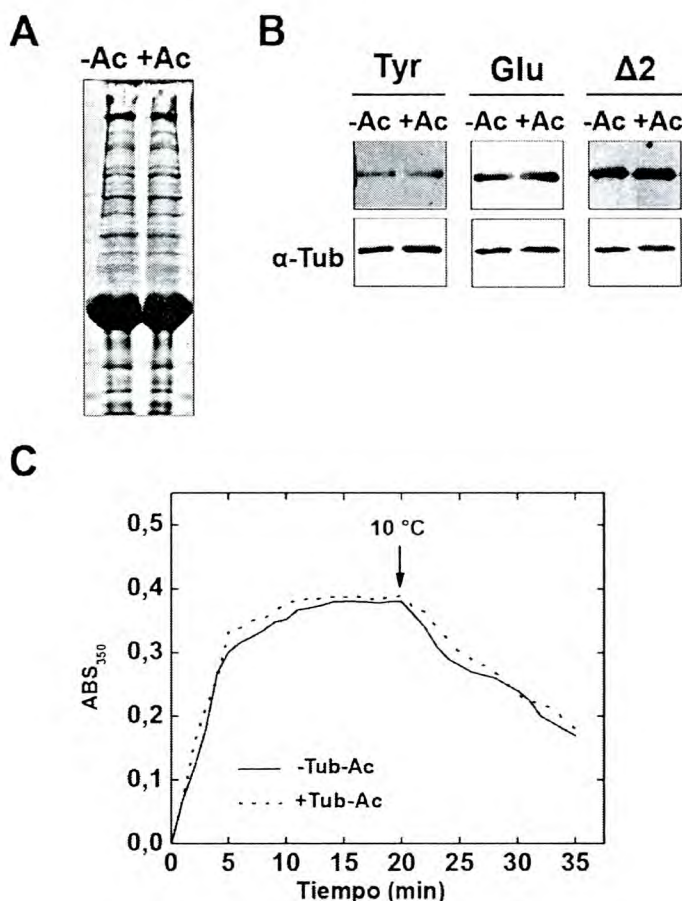


Figura 12: Comparación de preparaciones de tubulina enriquecidas o empobrecidas del isotipo acetilado

Se prepararon dos SN₇, uno enriquecido (-Ac) y otro empobrecido (+Ac) en tubulina acetilada. Se compararon ambas preparaciones mediante (A) SDS-PAGE teñido con Coomassie blue (B) Western blot revelado contra tubulina tirosinada (Tyr), tubulina Glu (Glu) y tubulina Δ2 (Δ 2), como control de carga en el panel inferior se muestra el contenido de α-tubulina (C) Ensayo de turbidimetría: se indujo la polimerización a 37 °C y luego de llegar a plateau (20 minutos) se bajó la temperatura a 10 °C para inducir la depolimerización de los microtúbulos. Todo el proceso fue monitoreado midiendo la absorbancia a 350 nm. Se muestra un experimento representativo. (n=2).

Actividad deacetilasa a lo largo del ciclo de tubulina

Considerando que HDAC6 puede unirse a microtúbulos *in vivo* (Asthana et al., 2013; Haggarty et al., 2003; Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003), y que se ha reportado que en preparaciones de tubulina purificada por ciclados la HDAC6 se encuentra en la fracción de MAPs (Haggarty et al., 2003) se decidió examinar si en nuestras condiciones experimentales la actividad deacetilasa co-ciclaba junto con la tubulina durante el proceso de purificación. Para poder evaluar si hay actividad deacetilasa es necesario tener tubulina acetilada, lo cual no es posible si no se agrega un inhibidor de la HDAC6. Pero de nuevo, si se agrega el inhibidor para enriquecer la tubulina en el isotipo acetilado, no se podría observar la actividad deacetilasa. Para superar este inconveniente lo que se hizo fue purificar tubulina usando TSA pero

al pellet del ciclo precedente al SN al cual se le iba a hacer la medición de actividad se lo resuspendió en buffer sin TSA. Por ejemplo, si se iba a medir la actividad en el SN₅, se resuspendió el P₂ en buffer sin TSA. SN₅ o SN₇ obtenido de esta manera poseen niveles aceptables de tubulina acetilada a la vez que contienen muy poco o nada de TSA. Se mezclaron alícuotas de SN₅ o SN₇ con un volumen de buffer o de SN₁ preparado en ausencia de TSA (como control positivo de sustrato). Como se observa en la figura 13 cuando se incubó el SN₅ a 37 °C (SN₅+buffer) los niveles de tubulina acetilada disminuyeron con el tiempo, por lo que se concluye que hay actividad deacetilasa en el SN₅. Por otro lado, al incubar el SN₇ (SN₇+buffer) a 37 °C el nivel de tubulina acetilada se mantuvo constante sugiriendo que ya no había actividad deacetilasa en esta preparación. Esta falta de deacetilación no fue debido a la presencia de inhibidor en el SN₇ o a que la tubulina de ese sobrenadante no era apta como sustrato ya que al incubarlo en presencia de SN₁ (SN₇+SN₁) los niveles de tubulina acetilada disminuyeron rápidamente. Por lo tanto, en SN₇ (bajo las condiciones evaluadas) no hay actividad deacetilasa. De esta manera el SN₇ puede ser utilizado como sustrato en ensayos para medir actividad deacetilasa de tubulina.

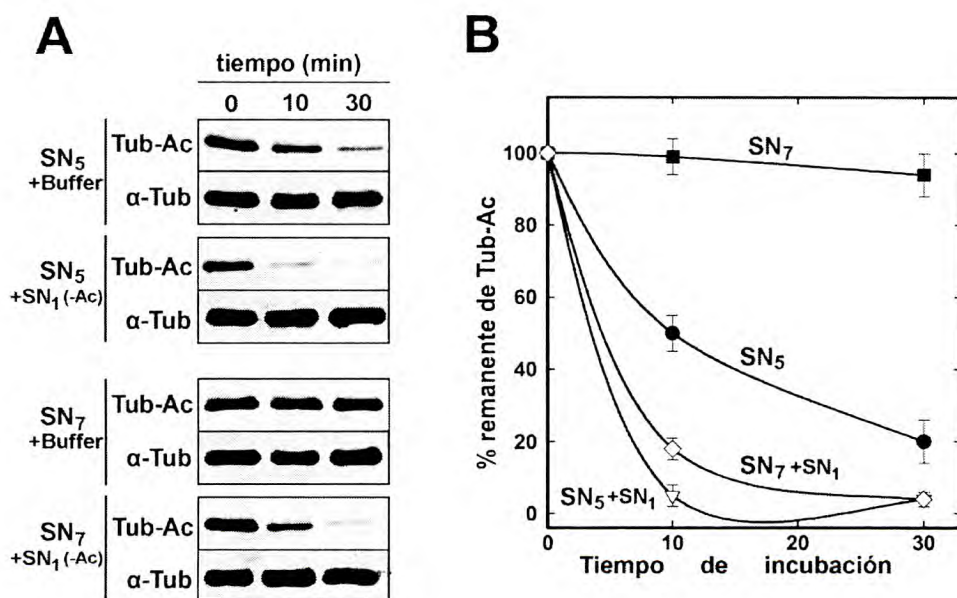


Figura 13: Actividad deacetilasa a lo largo del ciclado de tubulina

(A) Para evaluar la actividad deacetilasa de SN₅ y SN₇ se realizaron preparaciones de esos sobrenadantes que contuvieran tubulina acetilada pero no tuvieran TSA (ver materiales y métodos). A esas preparaciones se les agregó un volumen de buffer y se las incubó a 37 °C. A los tiempos indicados se tomaron muestras y se analizó su contenido de tubulina acetilada por Western blot. Para controlar que la tubulina presente en esas preparaciones fuera sustrato adecuado para la HDAC6 se sustituyó el volumen de buffer por uno de SN₁ preparado en ausencia de TSA, el cual es fuente de enzima pero no de tubulina acetilada (B) Se cuantificaron las bandas de (A) y se graficó el porcentaje remanente de tubulina acetilada en función del tiempo (el 100% es la muestra a tiempo 0).

En resumen, agregar TSA a los buffers utilizados para la purificación de tubulina por ciclos de polimerización/depolymerización permite obtener, de manera sencilla y a gran escala, preparaciones de tubulina purificada con un 64% de tubulina acetilada. Por otro lado, mediante el

método tradicional de ciclado (sin TSA) se obtiene una preparación de tubulina con un 0,2% del isotipo acetilado (300 veces menos tubulina acetilada que la otra preparación). Ambas preparaciones son análogas en cuanto al estado de tirosinación de la tubulina, la modificación postraducciona de tubulina que más a menudo sucede en paralelo con la acetilación. De esta manera se pueden disponer de dos preparaciones de tubulina purificada, enriquecida o depletada del isotipo acetilado, óptimas para realizar estudios bioquímicos relacionados al estudio del rol de la acetilación de tubulina.

CAPÍTULO II

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE TUBULINA ACETILADA

Una manera de cuantificar el porcentaje de tubulina acetilada de una muestra (respecto de tubulina total) es mediante la comparación de la cantidad de tubulina acetilada de esa muestra con la de una muestra en la cual el 100% de la tubulina se encuentra acetilada (estándar de tubulina acetilada). Para obtener dicho estándar se puede realizar una inmunopurificación de tubulina acetilada, sin embargo esto requiere la disponibilidad de mucho tiempo y dinero y por ende resulta poco práctico. Una alternativa a la inmunopurificación es la de acetilar químicamente una alícuota de la muestra a analizar, de manera que todas las moléculas de tubulina de esa muestra se encuentren acetiladas. A continuación se describe un método de cuantificación del porcentaje de tubulina acetilada de una muestra (respecto de tubulina total) basada en la comparación de la misma con un estándar de tubulina 100% acetilada generado mediante acetilación química.

Acetilación química de tubulina utilizando anhídrido acético

El anhídrido acético es un compuesto hidrosoluble que reacciona con aminas (y nucleófilos en general) formando ácido acético y la amina correspondiente acetilada. La cinética de la reacción es muy rápida (en el orden de minutos) y la constante de equilibrio es elevada, de manera que la reacción está desplazada hacia la formación de productos. Esto lo convierte en un reactivo apto para acetilar masivamente los grupos $\epsilon\text{-NH}_2$ de las lisinas de proteínas, al menos aquellas que estén accesibles al solvente. Según el estudio cristalográfico de la tubulina (Nogales et al., 1999) la lisina 40 de la α -tubulina se encuentra expuesta al solvente, lo que la haría acetilable por incubación con anhídrido acético. En efecto, si un SN_1 preparado en ausencia de TSA (contiene muy poca tubulina acetilada) es incubado con anhídrido acético se observa un gran aumento de la cantidad de tubulina acetilada en su Lys^{40} (Fig. 14). Nótese la disminución en la movilidad electroforética de la muestra acetilada químicamente. Esto puede ser causado por el aumento de masa molecular de la tubulina tras una acetilación masiva de lisinas y tirosinas (Means y Feeney, 1990) ya que hay 19 lisinas y 19 tirosinas en la molécula de α -tubulina, y/o a una disminución de la afinidad de la molécula de tubulina por el SDS debido al cambio de carga neta de la molécula de tubulina.

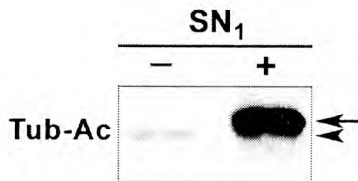


Figura 14: Acetilación química de SN_1 con anhídrido acético

Un SN_1 preparado en ausencia de TSA fue acetilado químicamente usando anhídrido acético como descrito en materiales y métodos. Se tomó una muestra antes (-) y otra después de la acetilación química (+) y se analizaron por Western blot con el anticuerpo 6-11B-1 anti tubulina acetilada. Nótese la disminución de la movilidad electroforética de la muestra acetilada químicamente (flecha) respecto de la no acetilada (cabeza de flecha).

Método de cuantificación de tubulina acetilada

El método de cuantificación desarrollado se basa en la capacidad del anhídrido acético de acetilar el grupo ϵ -NH₂ de la Lys⁴⁰ de la α -tubulina y se resume a continuación: se toma una alícuota de la muestra problema y se la acetila químicamente con anhídrido acético (**Ac-Qca**) (ver detalles en Materiales y Métodos). A otra alícuota se la procesa en paralelo pero se reemplaza el anhídrido por agua (**NoAc-Qca**). Luego se analiza el contenido de tubulina acetilada en volúmenes iguales de ambas muestras mediante Western blot. Se determina la densidad óptica (**DO**) de las bandas y se hace la siguiente relación matemática que nos da por resultado el porcentaje de tubulina que se encuentra acetilada en la Lys⁴⁰ (**% Tub-Ac**):

$$\% \text{ Tub-Ac} = \frac{\text{DO}_{\text{NoAc-Qca}}}{\text{DO}_{\text{Ac-Qca}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

El modelo asume lo siguiente: (1) el 100% de las moléculas de α -tubulina son acetiladas en sus Lys⁴⁰ mediante el tratamiento con anhídrido acético (2) la cantidad de tubulina total es la misma para ambas alícuotas, (3) la acetilación química, la cual es inespecífica y masiva, no afecta el reconocimiento y la especificidad del anticuerpo 6-11B-1 por su epítipo, y (4) hay una relación directamente proporcional entre cantidad de tubulina acetilada de una muestra y su DO.

A continuación se evalúa la veracidad de dichos supuestos. Hay que adelantar que algunas de estas premisas no pudieron ser probadas individualmente, pero en una instancia final se evaluó al método en su conjunto y se demostró la validez del mismo, validando indirectamente las premisas.

Condición de máxima acetilación

La acetilación química de un SN₁ de cerebro de rata (preparado en ausencia de TSA) resultó en un gran aumento del contenido de tubulina acetilada según se evaluó por Western blot (Fig. 14). Para confirmar que con una sola reacción de acetilación es suficiente para acetilar el máximo de moléculas de tubulina se realizaron 3 acetilaciones consecutivas sobre una misma muestra de un SN₁ preparado en ausencia de TSA. Se tomaron muestras luego de cada acetilación y se determinaron los niveles de tubulina acetilada de cada una de ellas por Western blot. Como se observa en la figura 15, todas las muestras tienen el mismo nivel de tubulina acetilada, sin importar cuántas veces consecutivas fueron acetiladas químicamente. Esto indica que una sola reacción de acetilación bajo las condiciones descritas es suficiente para acetilar el máximo de moléculas de tubulina en sus Lys⁴⁰. Si bien esto no demuestra estrictamente que el 100% de las moléculas de tubulina se acetilan en sus Lys⁴⁰ es coherente con esa proposición.

Cantidad de tubulina total en muestras acetiladas o no químicamente

Se comparó la cantidad de tubulina total de un SN₃ antes y después de acetilarlo químicamente, mediante 3 métodos: SDS-PAGE teñido con Coomassie blue, SDS-PAGE teñido con nitrato de plata y Western blot revelado con un anticuerpo anti α -tubulina (DM1A, Fig. 16). Tanto en el gel teñido con Coomassie blue como en el Western blot, se observa que la banda de tubulina es menor en la muestra que fue acetilada químicamente. Sin embargo, cuando las mismas

muestras se analizan en un SDS-PAGE teñido con nitrato de plata se observa lo contrario. Esta diferencia puede ser explicada como el resultado de artificios de cada una de las técnicas utilizadas. Por un lado, la iso especie del colorante Coomassie blue que se une a proteínas tiene carga neta negativa (Chial et al., 1993). Esto hace que se una a las proteínas, en parte, mediante la interacción iónica con aminoácidos básicos (como la lisina) que se encuentran cargados positivamente (Georgiou et al., 2008). Al acetilar las lisinas, se les quita la carga y por ende es de esperar que éstas ya no interaccionen tan favorablemente con el colorante. En cuanto a lo observado con anticuerpo anti α -tubulina, su epítipo (formado por 5 aminoácidos) contiene una lisina (Lys⁴³⁰) (Breitling y Little, 1986). Es de esperar entonces que al acetilar químicamente la tubulina se acetile también la Lys⁴³⁰ y con ello disminuya la reactividad del anticuerpo. Por último, el proceso de tinción de proteínas en un gel de poliacrilamida usando nitrato de plata es más efectivo mientras más ácidas son las proteínas (Chevallet et al., 2006). Al acetilar químicamente la tubulina se están neutralizando muchos residuos básicos, disminuyendo el pKa de la proteína y haciéndola mejor sustrato para la tinción con nitrato de plata.

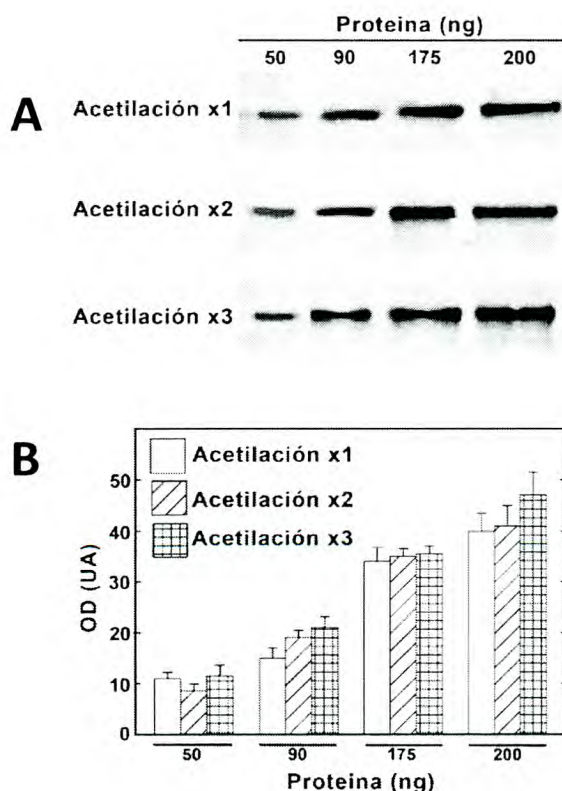


Figura 15: Acetilación química consecutiva de SN₁

(A) Un SN₁ preparado en ausencia de TSA fue acetilado químicamente con anhídrido acético por 3 veces consecutivas. Se tomaron muestras luego de cada reacción (1X, 2X y 3X) y comparó su contenido de tubulina acetilada sembrando 4 cantidades diferentes de muestra en un Western blot que se reveló con el anticuerpo 6-11B-1. (B) Se cuantificó la densidad óptica (Unidades Arbitrarias, UA) de las bandas de (A) de 3 experimentos independientes y se graficaron los valores medios (\pm D.E.) en función de los nanogramos de proteína sembrados y del número de veces que fue acetilada la muestra.

En conclusión, no se puede determinar mediante los métodos utilizados si cambia el nivel de tubulina total tras la acetilación química. Sin embargo, tampoco encontramos razón para pensar que esto pueda estar sucediendo. Además, como se mencionó previamente, el método fue evaluado en su conjunto con un desempeño satisfactorio, lo que eventualmente demuestra de manera indirecta esta presunción.

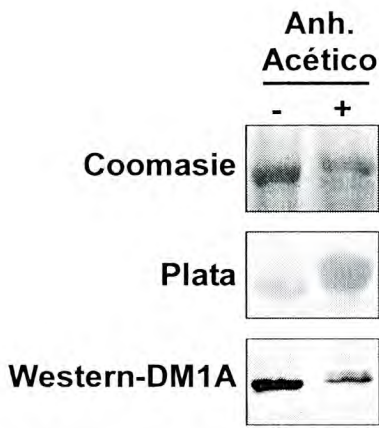


Figura 16: Cantidad de tubulina tras acetilación química

SN₃ preparado sin TSA fue incubado sin (-) o con (+) anhídrido acético y luego se analizaron ambas muestras (idéntico volumen) por SDS-PAGE teñido con Coomasie Blue (Coomasie), nitrato de plata (plata) o analizado por Western blot revelado con el anticuerpo monoclonal anti α -tubulina DM1A (Western-DM1A).

Afinidad y especificidad del anticuerpo 6-11B-1 por Lys⁴⁰ acetilada en muestras acetiladas químicamente

Dado que la acetilación química es masiva (todas las lisinas expuestas al solvente son acetiladas), se consideró la posibilidad de que la reacción generase nuevos epítopes para el anticuerpo (afectando su especificidad) o que cambiase su afinidad por la Lys⁴⁰ debido a un cambio en el entorno de la misma (tal como sucede para el anticuerpo anti α -tubulina). Para determinar esto se realizaron dos experimentos. El primero con la intención de estimar cuál es la probabilidad de generar nuevos epítopes en una proteína por acetilación de lisinas al azar y el segundo para evaluar de forma directa el efecto de la acetilación química sobre el reconocimiento del anticuerpo por su epítope.

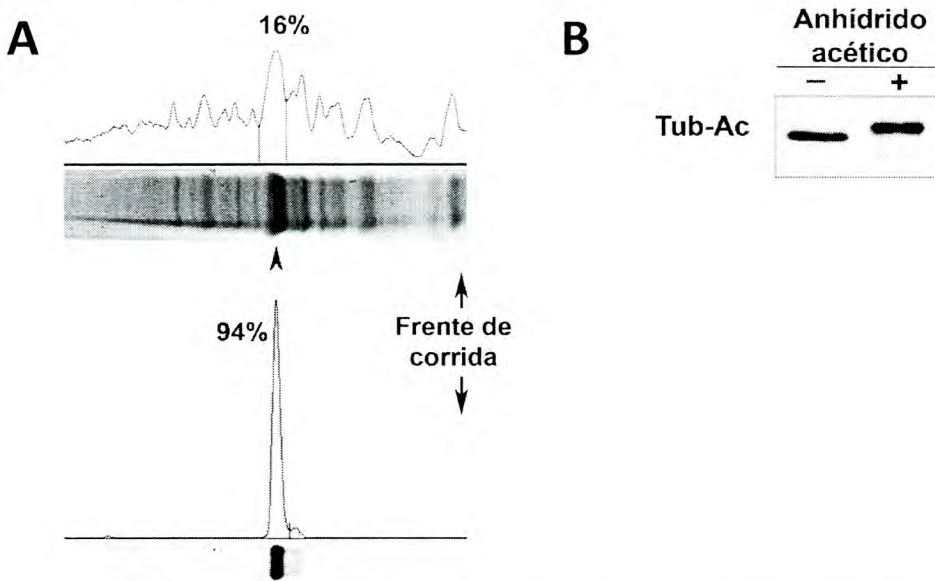


Figura 17: Acetilación química de SN₁ y de tubulina acetilada inmunopurificada

(A) Un SN₁ preparado en ausencia de TSA fue acetilado químicamente con anhídrido acético y se analizó por SDS-PAGE teñido con Coomasie blue (imagen superior) o por Western blot revelado con el anticuerpo 6-11B-1 (imagen inferior). Con las flechas se marca la parte superior del gel (origen) y con una cabeza de flecha se marca la banda correspondiente a tubulina (B) Se inmunopurificó tubulina acetilada, utilizando el anticuerpo 6-11B-1 y un SN₅ enriquecido en tubulina acetilada como sustrato, y se la procesó con (+) o sin (-) anhídrido acético de manera de acetilarla químicamente o no respectivamente. Ambas muestras se analizaron por Western blot revelado con 6-11B-1.

Para el primer objetivo se acetiló una mezcla compleja de proteínas (SN₁), en la cual la tubulina corresponde máximo a un 16% de las proteínas totales (Fig. 17A), y se analizó mediante Western blot la presencia de proteínas (diferentes de tubulina) reactivas al anticuerpo 6-11B-1. Como se observa en la figura 17 el 94% de la señal del Western blot se corresponde con la banda principal de tubulina mientras que el restante 6% podría ser atribuible a otra/s proteína/s, sin poder descartar que también se trate de tubulina. Esto demuestra que la probabilidad de generar nuevos epítopes para el anticuerpo 6-11B-1 por acetilación de lisinas al azar es muy baja. Por otro lado, se acetiló químicamente una muestra de tubulina que ya estaba acetilada naturalmente en el 100% de sus Lys⁴⁰ ⁽²⁾ y se analizó junto con la muestra original mediante Western blot utilizando el anticuerpo 6-11B-1. La cantidad de tubulina acetilada detectada es la misma en ambas muestras, lo que indica que no se generaron nuevos epítopes para el anticuerpo y que tampoco disminuyó su afinidad por la Lys⁴⁰ acetilada. En conclusión, la acetilación química de tubulina no afecta ni la especificidad ni la afinidad del anticuerpo 6-11B-1 por la Lys⁴⁰ acetilada de α -tubulina.

Proporcionalidad entre cantidad de tubulina acetilada y densidad óptica en Western blot

Para poder correlacionar la densidad óptica (DO) de una banda con la cantidad de proteína que esta representa de manera directa, tal como se plantea en la ecuación 1, es preciso que haya una relación directamente proporcional entre ambas variables. Una relación directamente proporcional está descrita por la función $Y = Cte \times X$ y gráficamente describe una línea recta que pasa por el valor (0,0). En términos prácticos esto significa que si hay el doble de proteína tiene que haber el doble de DO. No todos los anticuerpos se comportan de manera que satisfacen este criterio y, aquellos que lo hacen lo hacen sólo hasta una cantidad dada de proteína, ya que es un sistema saturable y eventualmente la DO llega a un *plateau*.

Para el caso del anticuerpo 6-11B-1 hay una relación directamente proporcional entre DO y cantidad de tubulina acetilada hasta aproximadamente 0.8 μ g de proteínas de SN₃ (Figura 18), lo que serían aproximadamente 440 ng de tubulina acetilada (en un SN₃ la tubulina representa aproximadamente el 55% de las proteínas totales). Cuando este método es utilizado con muestras de cantidad desconocida de tubulina acetilada se recomienda sembrar diferentes cantidades de muestra para poder corroborar que se está trabajando dentro del rango de proporcionalidad directa.

² estándar de tubulina 100% acetilada preparada por inmunoprecipitación usando el anticuerpo 6-11B-1 y un SN₅ enriquecido en tubulina acetilada como sustrato, ver materiales y métodos.

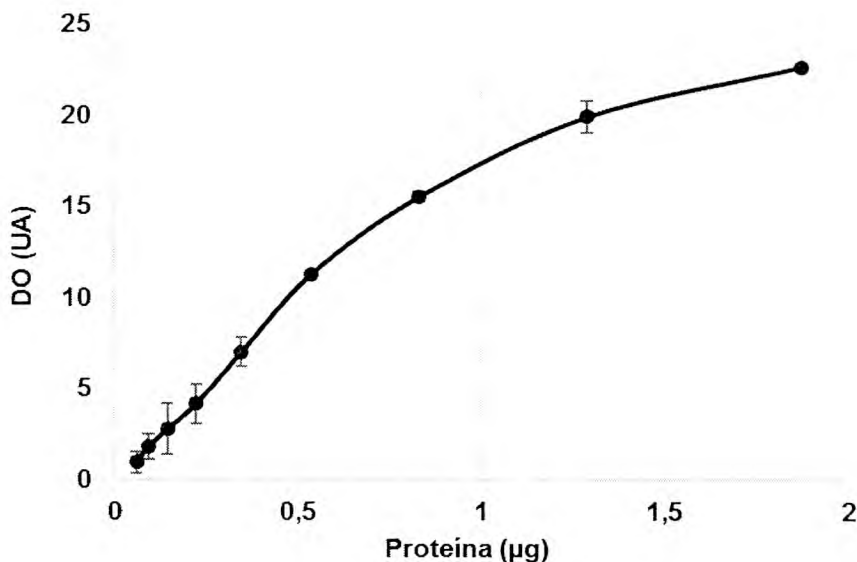


Figura 18: DO vs cantidad de proteína para el anticuerpo 6-11B-1

(A) Mediante Western blot revelado con el anticuerpo 6-11B-1, se analizaron distintas cantidades de proteína de un SN₃ acetilado. Se grafica la media \pm desviación estándar de la DO de las bandas expresada en unidades arbitrarias (UA) en función de los microgramos de proteína sembrados en el gel (n=3). En esta preparación la tubulina representa aproximadamente el 55% de las proteínas totales (resultados no mostrados).

Validación experimental del método

Se prepararon 3 muestras con diferentes porcentajes de tubulina acetilada (7,5%; 27,5% y 60%). Con este propósito, se utilizaron un SN₃ enriquecido y un SN₃ empobrecido en tubulina acetilada, bajo la presunción de que poseen un 64% y un 0,2% de tubulina acetilada respectivamente (Fig. 11). Luego utilizando el método desarrollado, se midió el porcentaje de tubulina que se encuentra acetilada en cada una de ellas, y se compararon los valores medidos con los valores esperados. Como se observa en la figura 19 en ninguna de las 3 muestras se observa una diferencia significativa entre el valor medido y el teórico. Si bien pareciera haber una tendencia a cuantificar por defecto (los valores medidos siempre fueron menores a los teóricos) el error absoluto siempre fue menor al 7% y en términos generales la performance del método fue muy satisfactoria. Se concluye entonces que el método es válido para medir el porcentaje de tubulina acetilada (con respecto a la tubulina total) en una muestra.

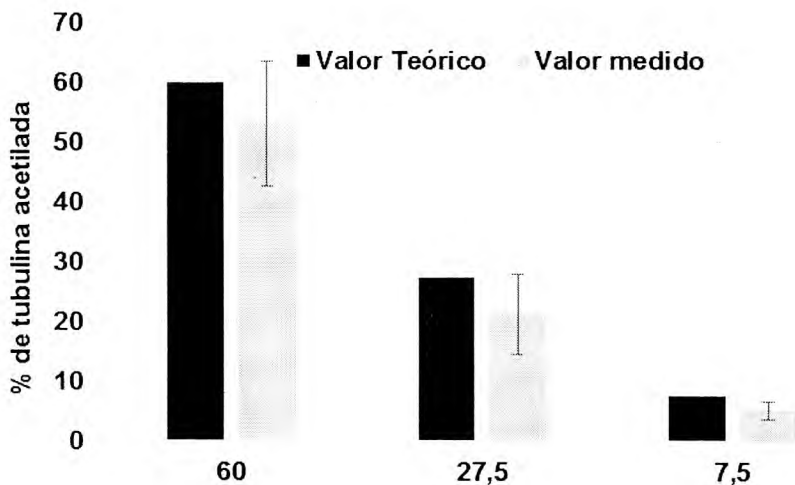


Figura 19: Cuantificación del porcentaje de tubulina acetilada y su comparación con valores teóricos.

Combinando SN₃ enriquecido y SN₃ empobrecido en tubulina acetilada en diferentes proporciones se prepararon 3 muestras conteniendo, teóricamente, 60%, 27,5% y 7,5% de tubulina acetilada (el SN₃ enriquecido tiene un 64% de tubulina acetilada y el empobrecido 0.2%). Luego se midió el porcentaje de tubulina acetilada en cada una de ellas usando el método aquí desarrollado. Para los valores medidos se muestra la media de 3 experimentos con su desviación estándar.

Efecto de detergentes sobre la acetilación química

Frecuentemente, para obtener la muestra a la que se le quiere medir el contenido de tubulina acetilada es necesario utilizar buffers que contengan detergentes, tales como Tritón x-100 o SDS. Por ejemplo en el caso de líneas celulares en cultivo. Para poder utilizar este método en dichos casos es condición necesaria que la presencia de esos detergentes no afecte la reacción de acetilación química de las lisinas. Para evaluar esto se preparó un SN₁ empobrecido en tubulina acetilada, se le agregó SDS o Tritón X-100 en diferentes concentraciones (1 y 3 % concentración final) y se lo acetiló químicamente. Luego se evaluó su contenido de tubulina acetilada mediante Western blot. Como se observa en la figura 20, antes de la acetilación química (Input) el SN₁ no contenía niveles detectables de tubulina acetilada y luego de la acetilación química todas las muestras poseían iguales cantidades de tubulina acetilada, indicando que la presencia de esos detergentes a concentraciones tan altas como 3% no afecta la reacción de acetilación química de las lisinas.

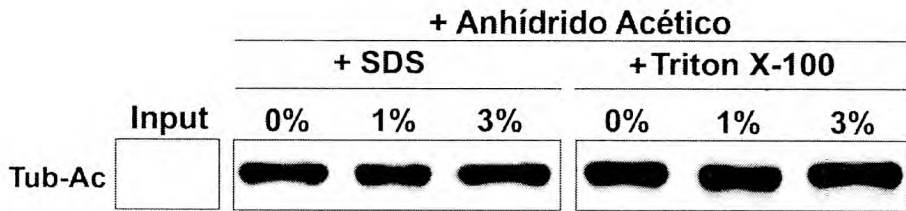


Figura 20: Efecto de detergentes sobre la acetilación química de tubulina

Se preparó un SN₁ empobrecido en tubulina acetilada (input) y se acetiló químicamente (+Anhídrido acético) en presencia de 0%, 1% o 3% de Triton X-100 o de SDS. Se analizó el contenido de tubulina acetilada de las muestras por Western blot. Se muestra un experimento representativo.

Cuantificación de tubulina acetilada en cultivos celulares

Utilizando el método de cuantificación aquí desarrollado, se cuantificó el porcentaje de tubulina acetilada de varias líneas celulares tratadas o no con TSA (Fig. 21) o taxol (Fig. 22) (dos drogas que aumentan el nivel de tubulina acetilada de las células). En paralelo se observaron microtúbulos acetilados mediante inmunofluorescencia a fin de evaluar cómo se correlaciona la información que proveen ambas técnicas. El nivel de tubulina acetilada basal de las células CHO, COS y CAD es menor al 10% y al tratarlas con TSA aumenta significativamente (Fig. 21A). Por otro lado, el tratamiento de las células CHO y COS con taxol (Fig. 22) produce un aumento de tubulina acetilada mucho más leve, alrededor de dos veces el valor basal. Tanto en el experimento con TSA como Taxol, las imágenes de inmunofluorescencia se corresponden en líneas generales con los datos obtenidos por el método de cuantificación.

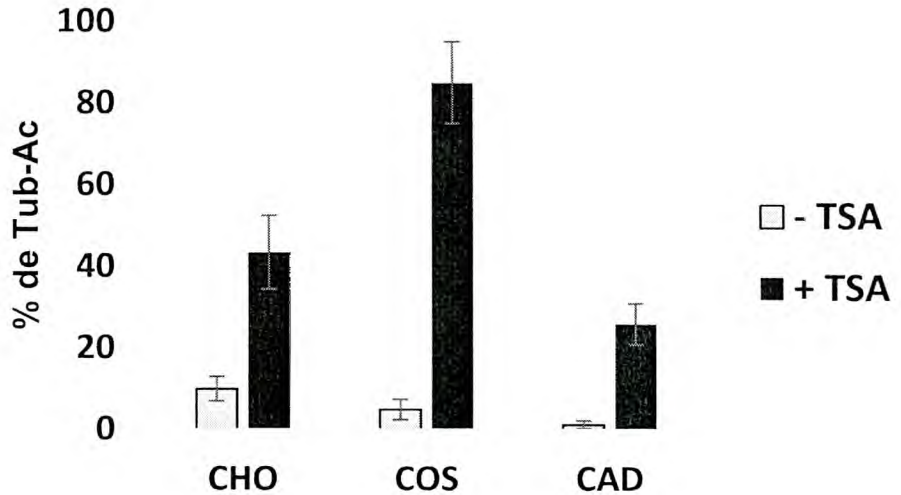
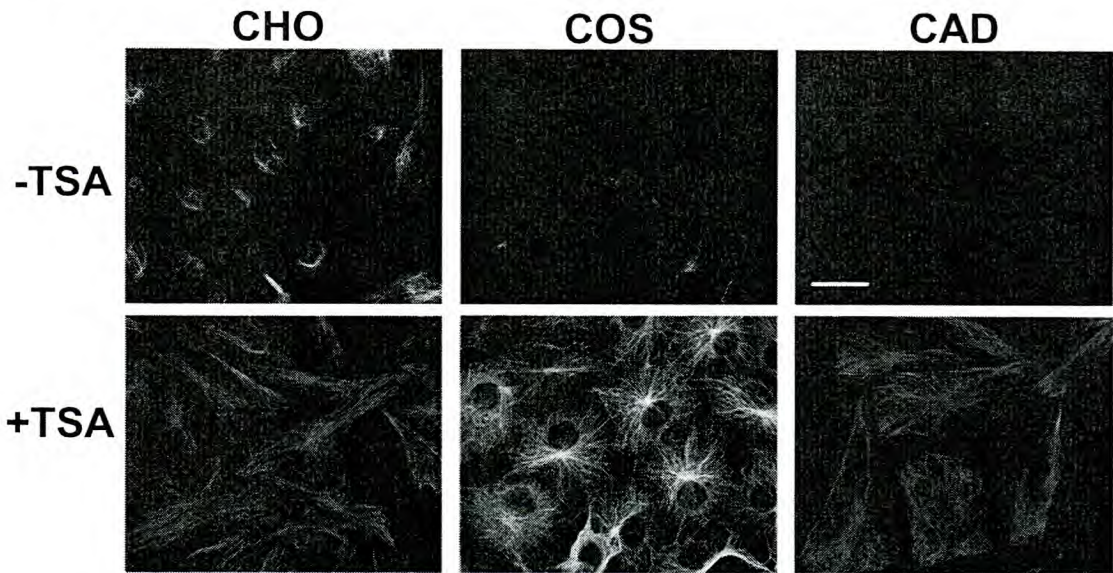
A**B**

Figura 21: Cuantificación de tubulina acetilada y análisis por inmunofluorescencia de líneas celulares tratadas con TSA.

(A) Células CHO, COS y CAD crecidas en cultivo fueron tratadas con (+TSA) o sin (-TSA) TSA 5 μ M por 6 horas y luego se midió su contenido de tubulina acetilada por el método de acetilación química como descrito en Materiales y Métodos. (B) Las mismas líneas celulares de (A) fueron crecidas sobre un cubreobjetos y procesadas de la misma manera (+TSA, -TSA; 6 h). Posteriormente se visualizaron los microtúbulos acetilados (6-11B-1) por inmunofluorescencia. Barra de escala = 20 μ m.

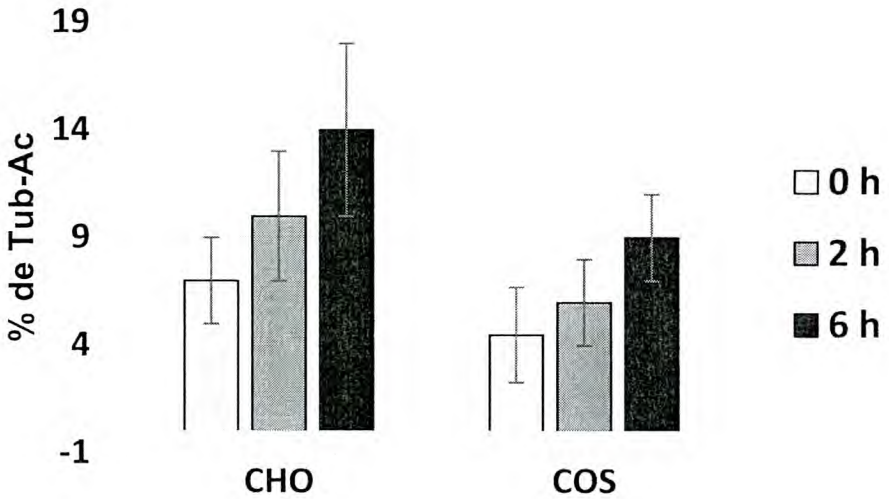
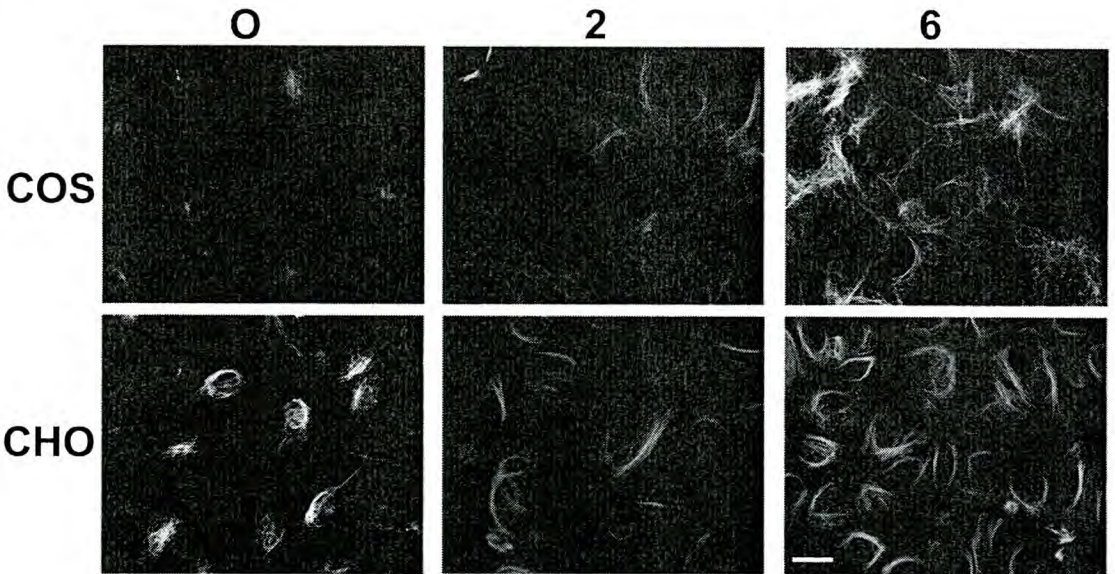
A**B**

Figura 22: Cuantificación de tubulina acetilada y análisis por inmunofluorescencia de líneas celulares tratadas con taxol.

(A) Células CHO y COS crecidas en cultivo fueron tratadas con taxol 5 μM por 0, 2 y 6 horas y luego se midió su contenido de tubulina acetilada por el método de acetilación química como descrito en materiales y métodos. (B) Las mismas líneas celulares de (A) fueron crecidas en paralelo sobre un cubreobjetos y procesadas de la misma manera (taxol 5 μM por 0, 2 y 6 h). Posteriormente se visualizaron los microtúbulos acetilados (6-11B-1) por inmunofluorescencia. Barra de escala = 20 μm .

En resumen, se desarrolló un método que permite, de manera rápida y de bajo costo, cuantificar el porcentaje de tubulina que se encuentra acetilada en una muestra. Este método es aplicable tanto a muestras de tubulina purificada como a cultivos celulares ya que no es afectado por la presencia de detergentes como el tritón X-100 o el SDS.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL COMPLEJO TUBULINA ACETILADA-PMCA

Conocer la bioquímica de un complejo proteico es un primer paso hacia un entendimiento acabado de esa interacción y cómo la misma afecta la fisiología celular. En este capítulo se aborda un estudio bioquímico sobre el complejo tubulina acetilada-PMCA con el fin de sentar una base sobre la cual se puedan basar futuros estudios referidos al rol fisiológico de la acetilación de tubulina.

Interacción de PMCA con microtúbulos *in vitro*

PMCA puede asociarse con tubulina dimérica (Monesterolo et al., 2008), sin embargo, es incierto si esta asociación es posible cuando la tubulina está formando parte de un microtúbulo. Para determinar si la PMCA puede interaccionar con microtúbulos *in vitro* se mezclaron membranas disueltas en detergente (fuente de PMCA, ver Materiales y Métodos) con SN₃ preparado en presencia de TSA y luego se incubó la mezcla a 37 °C en presencia de taxol (agente estabilizante de microtúbulos) para inducir la polimerización de los microtúbulos. Se centrifugó para separar los microtúbulos y todas las proteínas asociadas a ellos (precipitado) de la tubulina dimérica (sobrenadante) y se analizó el contenido de PMCA y tubulina acetilada en ambas fracciones mediante Western blot. Alrededor de un 65% de la PMCA se encuentra en la fracción precipitada (Fig. 23). Esta precipitación es debida, en parte, a la asociación de la PMCA con microtúbulos ya que si se omite la tubulina (y por ende los microtúbulos), o si se agrega calcio y calmodulina (condición en la cual el complejo se disocia parcialmente) sólo precipita un 30 o un 35% de la PMCA, respectivamente. Este porcentaje basal de PMCA que precipita (en ausencia de tubulina) probablemente sea debido a una agregación inespecífica de proteínas de membrana por la incubación a 37 °C, ya que si la muestra se mantiene en frío durante todo el proceso el 100% de la PMCA se mantiene en el sobrenadante (resultado no mostrado). Estos resultados indican que la PMCA puede asociarse a microtúbulos *in vitro*.

Participación de MAPs en la asociación PMCA-microtúbulos *in vitro*

Dado que las MAPs clásicas se asocian a la pared externa del microtúbulo y son relativamente abundantes en preparaciones de tubulina de un ciclo (muy similar a tubulina de 3 ciclos, Fig. 12A) se planteó la hipótesis de que las MAPs podrían estar participando como intermediarias en la formación del complejo tubulina acetilada-PMCA. Para aclarar este punto se hizo otro experimento de coprecipitación, similar al anterior, pero utilizando una preparación de tubulina carente de MAPs. Al igual que en el experimento anterior el porcentaje de PMCA que precipita en presencia de microtúbulos es mucho mayor que en su ausencia (77% vs 45%), indicando que efectivamente la PMCA se está asociando a los microtúbulos (Fig. 24). Se concluye entonces que la asociación de la PMCA a los microtúbulos no está mediada por las MAPs clásicas.

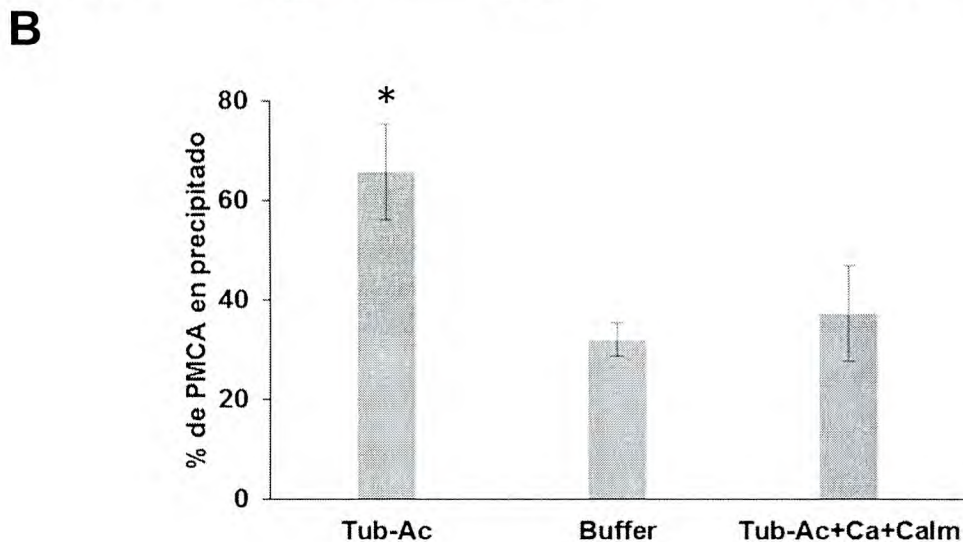
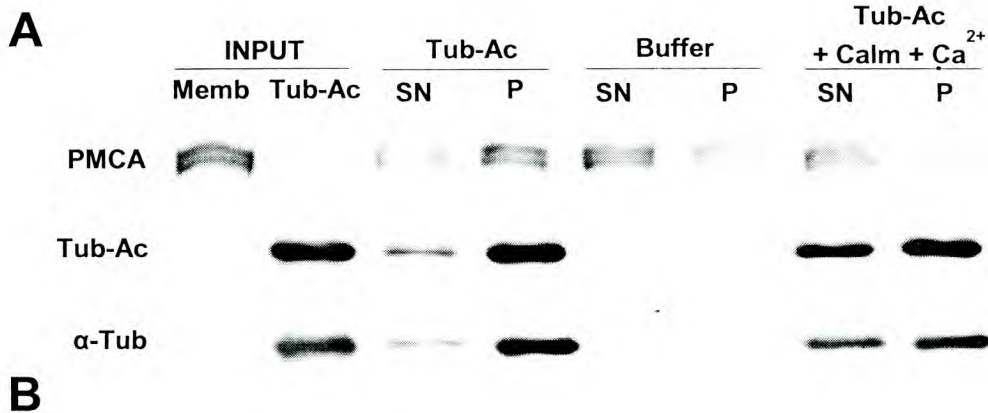


Figura 23: Coprecipitación de PMCA con microtúbulos *in vitro*

(A) Una preparación de membranas disueltas en tritón X-100 (Memb) se mezcló en frío con SN₃ enriquecido en el isotipo acetilado (Tub-Ac), o con Tub-Ac adicionado con calcio 5 mM y calmodulina 400 nM (Tub-Ac+Ca+Calm) o sólo con el buffer de la preparación de tubulina (buffer) e incubadas a 37 °C. Luego se centrifugó la mezcla y se analizó por Western blot el contenido de PMCA y tubulina acetilada en precipitado (P) y en sobrenadante (SN). (B) Se cuantificaron las bandas de PMCA en (A) y se calculó el porcentaje de PMCA en precipitado respecto del total de PMCA (sobrenadante más precipitado). Se muestra el promedio ± D.E. de 3 experimentos independientes. Las muestras marcadas con (*) tienen un valor significativamente diferente de aquellas que no están marcadas por test-t, p<0.05.

Asociación de PMCA a microtúbulos en función del dinamismo de los mismos

Está descripto para la Na⁺/K⁺-ATPasa (otra P-ATPasa que une tubulina acetilada) que el proceso de asociación con microtúbulos (*in vitro*) sólo sucede si los microtúbulos son dinámicos. Una vez que se formó unión entre ambas moléculas la misma se mantiene aunque los microtúbulos se estabilicen (Zampar et al., 2009). Conociendo los paralelismos entre esta P-ATPasa y la PMCA se planteó la pregunta de si lo mismo podría suceder con la PMCA. Para abordar esta pregunta se realizaron experimentos de coprecipitación de PMCA con microtúbulos preensamblados y estabilizados: se mezclaron membranas disueltas en detergente con una preparación de microtúbulos estabilizados, los cuales se formaron previamente por la incubación de un SN₃ enriquecido en tubulina acetilada a 37 °C por media hora en presencia de taxol. Como

control positivo se mezcló la preparación de membrana disuelta en detergente con tubulina dimérica en frío y luego se incubó a 37 °C para fomentar la formación de microtúbulos (tal como en los experimentos descritos anteriormente). Como se puede observar en la figura 25 tanto en el control positivo como en la muestra problema la PMCA coprecipita con los microtúbulos (más del 66% de PMCA en precipitado contra 20% cuando no hay tubulina). A su vez se corrobora que los microtúbulos no continúan polimerizando luego de media hora de incubación a 37 °C en presencia de taxol, ya que la cantidad de tubulina (total y acetilada) en el precipitado es la misma luego de media o una hora a 37 °C. Se puede concluir entonces que, a diferencia de la Na⁺/K⁺-ATPasa, no es necesario que los microtúbulos sean dinámicos para que la PMCA se asocie a los mismos.

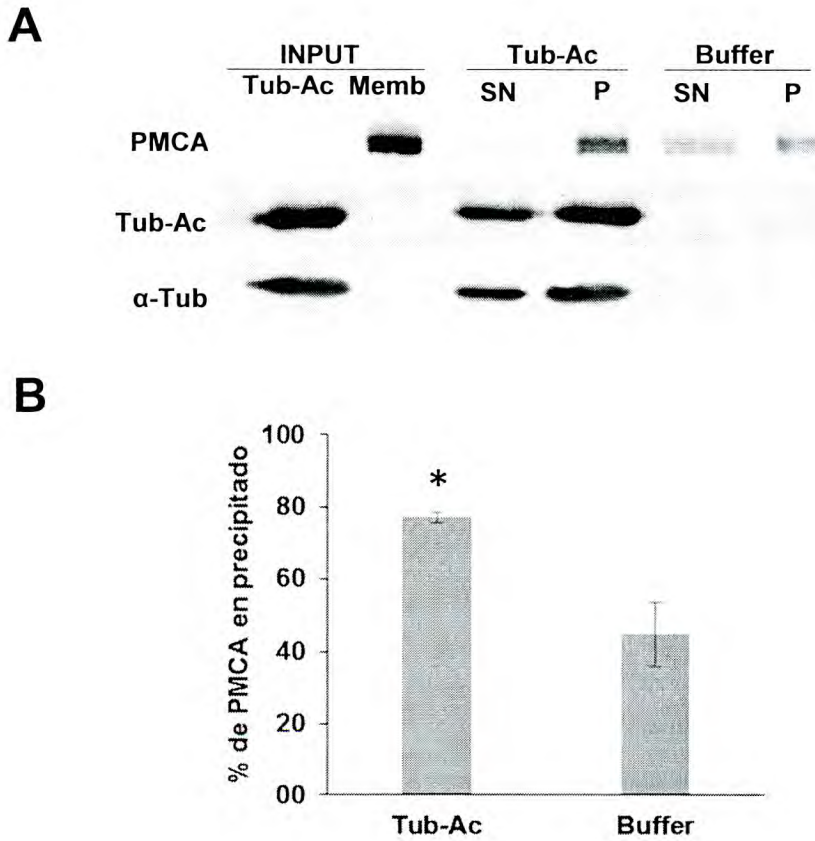


Figura 24: Coprecipitación de PMCA con microtúbulos sin MAPs

(A) Se mezcló una preparación de membranas disueltas en detergente (Memb) con tubulina enriquecida en el isotipo acetilado purificada por columna de fosfocelulosa (Tub-Ac) o sólo con el buffer de la preparación de tubulina (buffer) e incubadas a 37 °C. Se centrifugó la mezcla y se analizó por Western blot el contenido de PMCA y tubulina acetilada en precipitado (P) y en sobrenadante (SN). (B) Se cuantificaron las bandas de PMCA en (A) y se calculó el porcentaje de PMCA en precipitado respecto del total de PMCA (sobrenadante más precipitado). Se muestra el promedio ± D.E. de 3 experimentos independientes. Las muestras marcadas con (*) tienen un valor significativamente diferente de aquellas que no están marcadas por test-t, p<0.05.

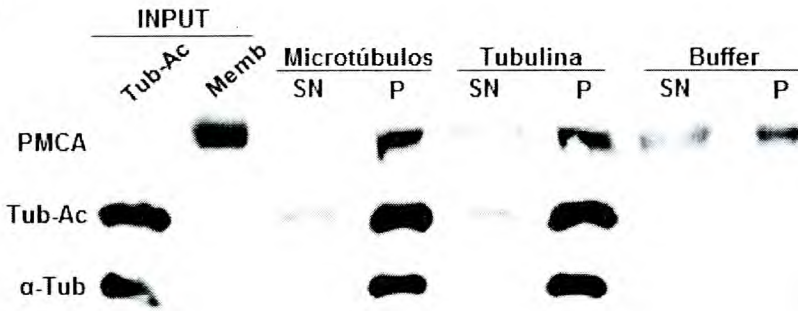
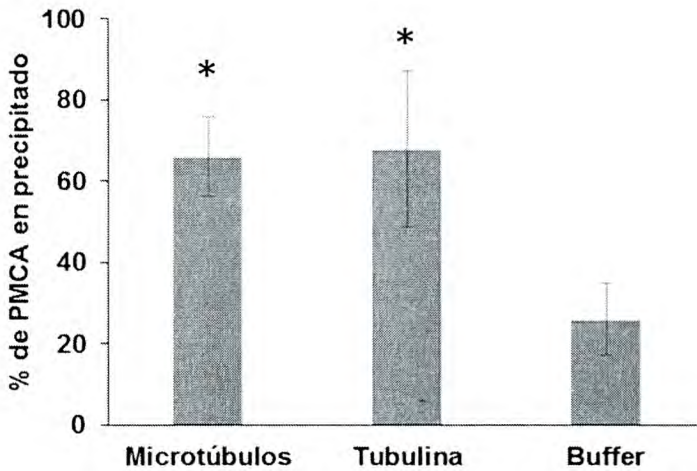
A**B**

Figura 25: coprecipitación de PMCA con microtúbulos preensamblados y estabilizados

(A) Esquema del experimento: se incubó una preparación membranas disueltas en detergente con microtúbulos preensamblados (Microtúbulos), o con tubulina soluble (Tubulina) o con el buffer de la preparación de tubulina (Buffer), por media hora a 37 °C. Luego se centrifugaron todas las muestras (para más detalles referirse a materiales y métodos) y (B) se analizó por Western blot el contenido de PMCA, α-tubulina (α-Tub) y tubulina acetilada (Tub-Ac) en precipitado (P) y en sobrenadante (SN). (C) Cuantificación del porcentaje de PMCA en precipitado respecto del total de PMCA (sobrenadante más precipitado). Se muestra el promedio ± D.E. de 2 experimentos independientes. Las muestras marcadas con (*) tienen un valor significativamente diferente de aquellas que no están marcadas por test-t, p<0.05.

En resumen, se demostró que la PMCA puede interactuar con microtúbulos y que esta interacción es independiente tanto de la presencia de MAPs como del dinamismo de los microtúbulos.

DISCUSIÓN

La acetilación de tubulina fue descrita hace casi 30 años (L'Hernault y Rosenbaum, 1985) y hay un volumen importante de trabajos publicados al respecto. Sin embargo, el o los roles fisiológicos de la acetilación de tubulina continúan siendo un tema de disenso y misterio. Las limitaciones de las técnicas utilizadas en dichos trabajos explican parcialmente esta situación y constituyen la base sobre la cual se planteó el objetivo general de este trabajo de Tesis: desarrollar herramientas y conocimientos que permitieran avanzar en el conocimiento del rol fisiológico de la acetilación de tubulina. Por ello la discusión está organizada de la siguiente manera: en primer lugar se expone un análisis de las principales técnicas utilizadas en el estudio de tubulina acetilada y sus limitaciones. Luego se realiza una evaluación en términos generales de la contribución de este trabajo de Tesis. Posteriormente se analizan resultados no relacionados directamente con los objetivos planteados en este trabajo y por último se hacen reflexiones y especulaciones relacionadas al rol fisiológico de la acetilación de tubulina.

LIMITACIONES DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DE TUBULINA ACETILADA

La mayoría de los trabajos en donde se infiere alguna función para la acetilación de tubulina se basan exclusivamente en experimentos con células en cultivo en donde aislar variables concernientes a la acetilación de tubulina es particularmente complicado (ver más adelante). Una menor proporción de trabajos también se apoyan en experimentos bioquímicos comparativos pero carecen de preparaciones de tubulina que sólo difieran en su grado de acetilación (o al menos no comprobaron que así fuera). Los únicos trabajos en donde se realizan experimentos bioquímicos ideales, es decir con preparaciones de tubulina que sólo difieren en el grado de acetilación (Howes et al., 2014; Soppina et al., 2012; Walter et al., 2012), no encuentran diferencias entre ambos isotipos en ninguno de los parámetros evaluados.

Respecto de los trabajos con cultivos celulares, algunos de ellos evalúan y correlacionan cambios en el estado de acetilación de la célula con algún cambio en el fenotipo celular (por ejemplo grado de diferenciación de la célula), pero no corroboran que el resto de las modificaciones postraduccionales de tubulina no varíen en paralelo con la acetilación. Extraer conclusiones en estas condiciones es particularmente arriesgado dado que, en general (en células), la poliglutamilación y particularmente la detirosinación/tirosinación varían en paralelo con la acetilación (los microtúbulos al mismo tiempo que se acetilan se detirosinan). Por ende, pueden ser estas otras modificaciones postraduccionales de tubulina (o todas las modificaciones en su conjunto) las responsables del fenotipo celular y no la acetilación.

Otra estrategia utilizada en experimentos con cultivos celulares es modificar la actividad de las enzimas involucradas en la acetilación de tubulina, principalmente HDAC6 y α -TAT1, ya sea por inhibidores químicos (en el caso de HDAC6) o por *KO*, silenciamiento o sobreexpresión de las mismas. Como se mencionó en la Introducción, estas enzimas tienen efectos sobre los microtúbulos que son independientes de la (de)acetilación de tubulina y además también modifican postraduccionales otras proteínas (esto aplica particularmente para la HDAC6). Por ende, es probable que al utilizar esta estrategia se detecten cambios fenotípicos que no deberían ser atribuidos a la acetilación de tubulina.

Una tercera estrategia que se utilizó en experimentos con células en cultivo es la de expresar en las células una mutante de α -tubulina en la cual se reemplazó la lisina 40 por un aminoácido que imita la lisina sin acetilar (mutación K40R) o la lisina acetilada (K40Q), pero que

no pueden ser modificadas por las enzimas acetiltransferasas o deacetilasas respectivamente. Las limitaciones de esta estrategia radican en que estas mutantes nunca han sido extensivamente caracterizadas y es incierto hasta que punto la arginina o la glutamina pueden imitar una lisina o una lisina acetilada respectivamente. Es posible que las mutantes produzcan un fenotipo que no producirían ni la tubulina acetilada ni la no acetilada. Esto de hecho ha sido observado para dos proteínas diferentes cuando se sustituyó la lisina por glutamina, imitando a la lisina acetilada (Fujimoto et al., 2012; Lammers et al., 2010).

Dadas las limitaciones mencionadas de los experimentos *in vivo* y en células en cultivo cuando éstos son realizados a fin de averiguar un rol fisiológico para la acetilación de tubulina, resulta de suma importancia que sean complementados con experimentos bioquímicos, los cuales permiten trabajar con elementos purificados minimizando el número de variables que intervienen. Sin embargo, la mayoría de los experimentos bioquímicos descritos al día de la fecha tienen también sus propias limitaciones. Las técnicas utilizadas para conseguir preparaciones de tubulina acetilada y no acetilada se han basado principalmente en extracción de tubulina de células en cultivo tratadas o no con inhibidores de HDAC6 (o paninhibidores de histonas deacetilasas). En algunos trabajos, los autores realizan el ensayo bioquímico con los extractos celulares completos, y en otros purifican parcialmente la tubulina (o los microtúbulos). En ambos casos la objeción es similar a la de los trabajos con células en cultivo, es decir, la HDAC6 deacetila y regula la actividad de muchas otras proteínas además de la tubulina, por lo que es de esperar que células tratadas con inhibidores de la HDAC6 posean alterados muchos factores además del grado de acetilación de tubulina, como ser el nivel de acetilación de otras proteínas y la identidad y la organización de las mismas, ya que la HDAC6 modula factores de transcripción y participa activamente en la eliminación de proteínas mal plegadas (ver Introducción).

APORTE DE ESTE TRABAJO DE TESIS

Método de purificación de tubulina enriquecida en el isotipo acetilado

En vista de lo planteado, es evidente que es importante realizar estudios bioquímicos con preparaciones de tubulina pura que sólo difieran en el grado de acetilación para poder avanzar con seguridad en el conocimiento acerca del rol de la acetilación de tubulina. En este trabajo de Tesis se desarrolló y caracterizó un método de purificación de tubulina, el cual difiere del método tradicional (conocido y utilizado por la mayoría de los laboratorios que trabajan con tubulina) solamente en el agregado de TSA (inhibidor de HDAC6, una droga de costo medio y comercialmente disponible) y que permite obtener una preparación de tubulina pura (o con MAPs) con un 64% de tubulina acetilada (respecto de tubulina total) (Fig. 11). Por otro lado, bajo nuestras condiciones experimentales, la tubulina purificada en ausencia de TSA posee alrededor de un 0.2% de la tubulina acetilada, valor que es 300 veces menor que el de la preparación hecha en presencia de TSA. De modo que se pueden disponer de preparaciones de tubulina acetilada y no-acetilada para realizar estudios bioquímicos comparativos entre tubulina acetilada y no acetilada. Sumado a eso, es importante mencionar que ambas preparaciones son análogas en cuanto al estado de tirosinación de la tubulina, la modificación postraducciona de tubulina que más a menudo transcurre en paralelo con la acetilación (Fig. 12). Adicionalmente, la preparación de tubulina acetilada purificada contiene igual cantidad de las MAPs clásicas que la preparación de tubulina no-acetilada (Fig. 12), al menos bajo las limitaciones de la técnica utilizada para su comparación.

A juzgar por las imágenes presentadas en trabajos de otros grupos de investigación (Haggarty et al., 2003; North et al., 2003; Reed et al., 2006; Wickström et al., 2010), la purificación de tubulina por el método tradicional de ensamblamiento/desensamblamiento no siempre resulta en una preparación de tubulina con niveles tan bajos de tubulina acetilada como los observados en este trabajo de Tesis. Esto probablemente se deba a pequeñas diferencias en los protocolos como menores tiempo de incubación, utilización de cerebros procedentes de diferentes animales (rata, cerdo, vaca) o diferencias en los buffers utilizados que afecten la actividad de la HDAC6. En esos casos, conociendo que es la HDAC6 presente en esos extractos la que deacetila la tubulina en el proceso, se pueden manipular las condiciones de purificación para promover la deacetilación, como por ejemplo aumentando los tiempos de incubación, o cambiando alguna condición del buffer (uno o dos puntos de pH, etc.).

De esta manera, el método de purificación de tubulina enriquecida en el isotipo acetilado desarrollado en este trabajo de tesis es una herramienta poderosa (y necesaria), que nos permite realizar experimentos bioquímicos comparativos entre tubulina acetilada y no acetilada que sirven a su vez para complementar los experimentos realizados con técnicas de biología celular y molecular.

Método de cuantificación de tubulina acetilada

En este trabajo de Tesis también se describe un método muy simple y de bajo costo para cuantificar el porcentaje de tubulina acetilada respecto a la tubulina total que hay en una determinada muestra. Una revisión bibliográfica no mostró la existencia de trabajo alguno donde se cuantifique el porcentaje de tubulina acetilada en la/s muestra/s en estudio. En algunos trabajos los autores comparan el nivel de tubulina acetilada de la muestra en cuestión con el de otras muestras (por ejemplo axonemas de *Chlamydomonas*) pero desconocen el porcentaje de la tubulina que se encuentra acetilada en esas muestras patrón y por ende el de su muestra problema también. Sin embargo, a pesar de que nadie lo ha hecho, la cuantificación del porcentaje de tubulina acetilada de una muestra es importante: por un lado, permite estandarizar (y por ende reproducir) experimentos. Por otro (y sobre todo), nos aporta un dato (el porcentaje de tubulina acetilada) que puede ser crucial en la interpretación de los resultados, por ejemplo en el potencial caso de que la acetilación de tubulina opere mediante un mecanismo molecular que implique un umbral o una relación no lineal entre el porcentaje de la tubulina que se encuentra acetilada y el efecto biológico que esta ejerce. Un ejemplo que ayuda a ilustrar este concepto es el siguiente:

"supongamos que la acetilación de tubulina produce estabilización de los microtúbulos, pero sólo cuando más del 90% de las moléculas de tubulina se encuentran acetiladas. Un grupo de investigación trabaja con una línea celular en la cual el 50% de la tubulina se encuentra acetilada (los investigadores no poseen esta información) y observan que al tatar esas células con tubacina (inhibidor de la HDAC6) el porcentaje de tubulina acetilada se duplica (es decir llega al 100%, de nuevo, ellos no conocen este número) al mismo tiempo se estabilizan los microtúbulos, tras hacer los controles respectivos concluyen que la acetilación de tubulina infiere estabilidad a los microtúbulos. Otro grupo trabaja con otra línea celular similar pero en la cual sólo el 6% de a tubulina se encuentra acetilada. Ellos tratan esas líneas celulares con tubacina y observan que la tubulina acetilada aumenta 10 veces su valor inicial (respecto de tubulina total), en valores relativos mucho más de lo que observó el otro grupo (sin embargo el porcentaje de tubulina

acetilada final es menor, 60% contra 100%). No observan ningún cambio en la estabilidad de los microtúbulos y por ende concluyen que la acetilación per se no modifica la estabilidad de los microtúbulos. O en el mejor de los casos, que alguna diferencia entre las líneas celulares utilizadas por ambos grupos (diferente a la acetilación de tubulina) es la responsable de dicha divergencia. Ambas conclusiones serían erradas en este hipotético caso y las diferencias en los resultados podrían ser explicadas de haberse cuantificado el porcentaje de la tubulina que estaba acetilado en ambos casos."

Aunque este ejemplo es hipotético parece una situación más que probable cuando se analizan los porcentajes reales de tubulina acetilada de líneas celulares antes y después del tratamiento con TSA o taxol (Fig. 21 y 22 respectivamente). Nótese que en el caso de las células CAD por ejemplo, tras 6 horas de incubación con TSA los microtúbulos acetilados se observan con claridad por inmunofluorescencia, y si se la analiza por Western blot, la tubulina acetilada aumentó su nivel unas 20 veces. Sin embargo, el porcentaje de tubulina que se encuentra acetilada en esa muestra no supera el 30%, lo cual puede considerarse un valor todavía bajo (en cerebro por ejemplo en promedio aproximadamente un 64% de la tubulina se encuentra acetilada, Fig. 11), remarcando la importancia de la cuantificación del porcentaje de la tubulina que se encuentra acetilada en una muestra.

Caracterización bioquímica del complejo tubulina acetilada-PMCA

Por último, en este trabajo de Tesis doctoral también se realizó un estudio sobre el complejo tubulina acetilada-PMCA. Conocer la bioquímica de un complejo proteico es un primer paso hacia un entendimiento acabado de esa interacción y cómo la misma afecta la fisiología celular. Puntualmente se determinó que los microtúbulos pueden interactuar (*in vitro*) con la PMCA y que esa interacción es independiente de las MAPs, así como del dinamismo de los microtúbulos. Esto abre la posibilidad de que esta interacción suceda *in vivo*, y en tal caso, podría ocurrir una regulación cruzada entre microtúbulos y PMCA, interacción que potencialmente puede ser muy importante dada la amplia gama de funciones tanto de los microtúbulos como del calcio citosólico.

OTROS RESULTADOS

Siguiendo con el esquema de discusión planteado al comienzo de la misma, a continuación se hace un análisis de resultados no relacionados directamente con los objetivos planteados en este trabajo.

Sustrato preferencial de HDAC6

Bajo nuestro sistema experimental se observó que la HDAC6 deacetila preferencialmente dímeros de tubulina, no pudiendo detectarse actividad deacetilasa sobre microtúbulos (Fig. 7 y otros resultados no mostrados). En bibliografía los resultados respecto del sustrato preferencial de la HDAC6 (dímeros o microtúbulos) son diversos. Ensayos *in vitro* realizados por Zhao *et al* (2010) indican que los dímeros de tubulina son mejor sustrato para la HDAC6 que los microtúbulos (aunque ambos pueden ser deacetilados), North *et al* (2003) no encuentran una preferencia entre ambos sustratos y Hubbert *et al* (2002) describen que sólo los microtúbulos son sustrato para la HDAC6. En todos estos estudios se utilizó como fuente de

enzima HDAC6 inmunopurificada y como sustrato tubulina purificada. Por otro lado, en células en cultivo se determinó que la tubulina dimérica es muy buen sustrato para la HDAC6 (Matsuyama et al., 2002). Dado que las condiciones experimentales con las que diferentes grupos arribamos a estas conclusiones divergentes son muy similares, es difícil encontrar una razón hipotética por la cual los resultados son contradictorios. Por ende, hasta que se aclare esto, sería prudente hablar del sustrato de tubulina preferente para la HDAC6 en términos especulativos.

Capacidad de polimerización y depolimerización en frío de tubulina acetilada y no acetilada

En este trabajo de tesis también se analizó la capacidad de polimerización y de depolimerización en frío de muestras purificadas de tubulina (con MAPs clásicas) enriquecidas y empobrecidas en el isotipo acetilado y no se encontraron diferencias entre ambas preparaciones (Fig. 12). Este resultado es similar al encontrado en otros dos trabajos en donde comparan preparaciones de tubulina pura con un alto o bajo contenido de tubulina acetilada y no encuentran diferencias en la capacidad de polimerización/depolimerización entre ambas preparaciones (Maruta et al., 1986; Soppina et al., 2012). En conjunto, estos resultados demuestran de que la acetilación *per se*, o a través de las MAPs clásicas, no influencia la capacidad de polimerización o depolimerización de la tubulina.

Inhibición de HDAC6 mediada por Ca²⁺

Un dato novedoso y potencialmente muy importante descubierto en este trabajo de Tesis es que la actividad deacetilasa de HDAC6 sobre tubulina puede ser inhibida por iones Ca²⁺. Esta conclusión deriva del análisis conjunto de los siguientes resultados: en homogenato hay una alta actividad deacetilasa de tubulina que puede ser inhibida por calcio (Fig. 7), y la enzima responsable de dicha actividad es la HDAC6 (Fig. 8). Si bien es incierto si este mecanismo de inhibición opera *in vivo*, ciertamente es algo a tener en cuenta cuando se piensa en los posibles roles de la acetilación y para futuros experimentos.

ESPECULACIONES SOBRE EL ROL FISIOLÓGICO DE LA ACETILACIÓN DE TUBULINA

Dado que el panorama sobre el rol fisiológico de la acetilación de tubulina es poco claro resulta tentador proponer modelos alternativos referidos tanto al rol que puede cumplir como a los mecanismos moleculares mediante los cuales podría operar.

Se puede pensar que la acetilación de tubulina ejerce su efecto a través del microtúbulo (microtúbulos acetilados difieren funcionalmente de los no acetilados), a través del dímero (los microtúbulos acetilados o no acetilados son funcionalmente análogos, no así los dímeros) o ambos. Por cuestiones de análisis se los considerará por separado pero no hay que olvidar que los posibles mecanismos mencionados podrían actuar simultáneamente.

Para el primer caso (que opere a través de los microtúbulos), como se mencionó previamente en base a experimentos *in vitro*, la acetilación de tubulina *per se* parece no tener un efecto sobre la cinética de polimerización/depolimerización y/o la estabilidad de los microtúbulos. Por ende, el efecto que pudiera ejercer la acetilación sobre los microtúbulos tendría que ser mediado por otra proteína diferente de la tubulina misma. La Lys⁴⁰ de α -tubulina (acetilada o no) se encuentra orientada hacia el lumen del microtúbulo y según estudios de crioelectromicroscopía (con resolución subnanométrica), el hecho de que un microtúbulo esté

integrado principalmente con tubulina acetilada o con tubulina no acetilada no tiene consecuencias sobre la arquitectura del mismo (Howes et al., 2014). Esto descarta la posibilidad de que la acetilación de la Lys⁴⁰ provoque algún cambio conformacional en la tubulina a gran escala que pueda ser detectado desde fuera del microtúbulo, y limita las proteínas “interpretadoras” de la acetilación a aquellas que de alguna manera tienen acceso al lumen del microtúbulo. Respecto a esto, estudios estructurales de microtúbulos han detectado partículas electrodensas dentro del lumen de los microtúbulos, tanto de microtúbulos axonemales como microtúbulos de neuronas o células CHO (Bouchet-Marquis et al., 2007; Garvalov et al., 2006; Nicastro et al., 2011; Topalidou et al., 2012). Estas partículas, las cuales pueden ser asumidas proteínas, en muchos casos tienen un arreglo periódico dentro del microtúbulo lo que da cuenta de su especificidad de unión y descartan un artificio técnico. La identidad de estas proteínas es desconocida hasta el momento, aunque se pueden plantear algunos candidatos. El primero, la α -TAT1, la cual necesariamente tiene que encontrarse dentro del lumen, aunque su relevancia respecto del rol de la acetilación es cuestionable ya que resulta un tanto anti-intuitivo que la misma proteína que produce la modificación postraduccional sea quien la interprete. Otra proteína candidato a “sensar” el lumen de los microtúbulos es la proteína estabilizadora de microtúbulos Tau. Un estudio *in vitro* determinó que una parte de la misma puede contactar el lumen de los microtúbulos (Kar et al., 2003), aunque otro estudio posterior, utilizando otra técnica, no pudo detectar Tau (o alguna parte de ella) en la parte luminal de los microtúbulos (Santarella et al., 2004). Las +TIPs por otro lado se unen al extremo (+) de los microtúbulos en crecimiento, el cual es una lámina abierta (que luego se cierra formando el microtúbulo). Desde esta posición tendrían un acceso menos restringido al lumen del microtúbulo al unirse a esta lámina que aún no se cerró. Esto las convierte en posibles candidatos también, sin embargo, aún no hay evidencias experimentales que soporten este modelo (tampoco que lo rechacen).

Considerando la ausencia de diferencias (estructurales y de dinamismo) entre microtúbulos acetilados y no acetilados y el hecho de que no se han identificado proteínas que efectivamente puedan distinguir entre ellos, cobra fuerza la posibilidad de que la acetilación de tubulina ejerza su efecto en la célula a través del dímero. Una función que podría cumplir el dímero no-acetilado es la de regular la síntesis de proteínas (a nivel transcripcional ó postranscripcional), ya sea de la misma tubulina (regulando quizás la expresión de diferentes isotipos de tubulina) o de otras proteínas. Recientemente se ha descrito que el dímero de tubulina deacetilada (y no el microtúbulo) se une a la GTPasa pequeña Rheb y así regula los niveles de Rheb unido a GTP, lo cual a su vez determina la actividad de Rheb (Lee et al., 2013). Esta GTPasa es conocida por activar el complejo mTORC (*mamalian target of rapamycin complex*) el cual regula la expresión de diferentes genes (Dobashi et al., 2011). Si bien no se ha comprobado que los niveles de tubulina acetilada regulen la expresión de genes mediante este mecanismo, ciertamente es una posibilidad. Por otro lado, en macrófagos, un aumento de los niveles de tubulina acetilada promueve un aumento de la transcripción de IL-10 a través de una mayor fosforilación de la MAPK p38 (Wang et al., 2014). En ese trabajo los autores no develan el mecanismo mediante el cual la acetilación de tubulina influye los niveles de fosforilación de p38 (ni tampoco si lo hace a través del dímero o el microtúbulo), pero claramente es un ejemplo de regulación de expresión génica mediada por acetilación de tubulina (directa o indirectamente).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la acetilación de la tubulina (a través del dímero) podría regular la expresión de los diferentes genes de tubulina. Diferentes estudios han demostrado que los niveles de tubulina total son regulados por la concentración del dímero en la

célula: tratamiento de células CHO con taxol (estabilizador de microtúbulos) inducen un aumento en la síntesis de tubulina (α y β), mientras que tratamientos con drogas depolimerizantes de tubulina (nocodazol, etc.) o la microinyección de dímeros de tubulina en la célula producen el efecto contrario (Caron et al., 1985; Cleveland et al., 1981, 1983). En ninguno de estos estudios se tuvo en cuenta el estado de acetilación de esos dímeros y cabe la posibilidad de que esto sea un factor que regule la manera en que los mismos alteran la expresión de los diferentes genes de tubulina. A continuación se exponen algunos ejemplos de literatura en donde se observa una correlación inversa entre cantidad de tubulina acetilada y cantidad de tubulina total, aunque en ninguno de ellos se establece una relación causal entre ambos fenómenos. Plantas que expresan una mutante de α -tubulina en la cual se reemplazó la Lys⁴⁰ por una glutamina o una alanina (dos aminoácidos sin carga que imitan a la tubulina acetilada) poseen niveles casi indetectables de tubulina y no se observan microtúbulos. Por el contrario, cuando la Lys⁴⁰ se reemplaza por una arginina (conserva la carga, imita a la lisina no acetilada) el fenotipo aberrante desaparece (Xiong et al., 2013). En otro estudio determinan que en neuronas de *C. elegans* el complejo elongador (*Elongator complex*), del cual forma parte Elp3 (una de las tubulina acetil-transferasas), acetila tubulina y que a su vez los niveles de tubulina acetilada se correlacionan inversamente con los niveles de α -tubulina (Solinger et al., 2010). En corteza prefrontal de pacientes alcohólicos los niveles de alfa y beta tubulina son mucho menores que en pacientes control (no alcohólicos) y a su vez tienen mayores niveles de tubulina acetilada (Erdozain et al., 2014). Los resultados de estos últimos 3 trabajos también podrían ser explicados por una activación de la degradación de la tubulina (la cual es otra potencial función de la acetilación), aunque el efecto tendría que ser indirecto ya que si la tubulina acetilada fuera más sensible a ser degradada habría una correlación inversa a la observada entre cantidad de tubulina y cantidad de tubulina acetilada.

Por último quisiera plantear un modelo que conjuga el dímero como principal efector fisiológico de la acetilación de tubulina con la potencial inhibición de HDAC6 por iones calcio dentro de las células. Consideremos los siguientes datos: la α -TAT1 trabaja principalmente sobre el microtúbulo, mientras que la HDAC6, según nuestro trabajo y otros (Matsuyama et al., 2002; Zhao et al., 2010b), principalmente sobre dímeros de tubulina. En cerebro por lo menos un 64% de la tubulina se encuentra acetilada (Fig. 11B) y a su vez hay suficiente actividad de acetilasa en un homogenato de cerebro como para deacetilar prácticamente toda esa tubulina en 45 minutos a 4 °C. Si bien estos datos provienen de homogenatos de cerebro, con fines argumentativos vamos a asumir que a grandes rasgos reflejan lo que se encuentra en una neurona o una célula glial. Con estos datos presentados, y bajo las condiciones asumidas, cabe imaginar que cuando un microtúbulo acetilado se desensambla (total o parcialmente) los dímeros de tubulina son deacetilados rápidamente por la HDAC6. Por ende, lo más probable es que en condiciones fisiológicas (en neuronas o células gliales) la población de dímeros de tubulina en la célula se encuentren en su mayoría deacetilados. Ante un evento celular en donde entra el calcio, habría un desensamble local de microtúbulos inducido por el calcio (los cuales *a priori* serían en su mayoría acetilados) al mismo tiempo que la HDAC6 se encontraría inhibida (por los iones Ca²⁺). De esa manera aumentaría la concentración local de dímeros acetilados, los cuales ejercerían su efecto sobre la fisiología celular (por ejemplo la regulación de la expresión génica). De esta manera, la acetilación de tubulina podría funcionar como un mecanismo dinámico de censado y de señalización (mediada por los dímeros de tubulina) de ciertas condiciones en las cuales se induce una entrada de calcio al citosol. Curiosamente, y en concordancia con este modelo, rodajas de hipocampo en cultivo tratadas con cloruro de potasio (el cual dispara la

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Trichostatin A (TSA), Tubacin, Triton X-100, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), anticuerpo monoclonal anti tubulina acetilada producido en ratón (clon 6-11B-1), anticuerpo monoclonal anti α -tubulina producido en ratón (clon DM1A), anticuerpo monoclonal anti tubulina tirosinada producido en ratón (clon Tub-1A2), anticuerpo monoclonal anti subunidad α de Na^+/K^+ -ATPasa producido en ratón (clon M7-PB-E9) MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid), Taxol, albúmina sérica bovina (BSA), fenantrolina, PMSF, cloruro de magnesio, EGTA, guanosina trifosfato (GTP), Coomassie blue R-250, adenina trifosfato (ATP), la fosfoceulosa y el cloruro de calcio son de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los anticuerpos secundarios fluorescentes infrarrojos anti IgG de ratón hecho en cabra IRDye[®] 800CW y el anti IgG de conejo hecho en cabra IRDye[®] 800CW son de Li-Cor Biosciences (Lincoln, NE, USA). Proteína G recombinante conjugada a Sepharose 4B es de Invitrogen Corp. (Grand Island, NY, USA). El anticuerpo anti IgG de ratón (H+L) hecho en mono Alexa Fluor[®] 488 es de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). El reactivo FluorSave es de Calbiochem/ EMD Biosciences (La Jolla, CA, USA). El suero fetal bovino es de Natocor (Córdoba, Argentina). El ácido bórico es de PlusOne, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia). El anhídrido acético es de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). La nicotinamida es de ICN Biomedicals y los anticuerpos anti tubulina-Glu y anti tubulina- $\Delta 2$ fueron hechos en el laboratorio. Glicerol es de Taurus, Argentina.

Métodos

Líneas celulares en cultivo

Las células CAD (un subclón de una línea celular catecolaminérgica derivada de un tumor neuronal) fueron cultivadas en DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12). Las células CHO (ovario de hámster chino) y COS (células tipo fibroblasto derivadas de riñón de mono verde africano) fueron cultivadas en DMEM. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en sus respectivos medios suplementados con 10% v/v de suero fetal bovino, 10 unidades/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina y mantenidas a 37 °C en una atmósfera de aire/ CO_2 (19:1) de alta humedad.

Electroforesis de proteínas y Western blot

Se separaron las proteínas por SDS-PAGE (geles al 10%) (Laemmli, 1970) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979). Luego de bloquearlas con leche descremada al 5% en PBS las membranas fueron incubadas con alguno de los siguientes anticuerpos por 4 horas a temperatura ambiente: anti α -tubulina, anti tubulina acetilada y anti tubulina tirosinada diluidos 1:5000 y anti tubulina-glu o anti tubulina- $\Delta 2$ diluidos 1:500, todos en PBS con leche descremada al 1% p/v. Se lavaron en PBS (3 x 5 minutos) y se incubaron con anticuerpos secundarios fluorescentes infrarrojos 1 hora a temperatura ambiente (diluidos 1:20 000 de PBS con leche descremada al 1%). Se lavaron nuevamente (3 x 5 minutos en PBS) y luego

fueron escaneadas en el escáner infrarrojo Odyssey (Li-Cor). Las bandas fueron cuantificadas utilizando el programa Scion Image (Scion Corporation).

Tinción de SDS-PAGE con Coomassie Blue

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE se tiñó el gel incubándolo por 10 minutos en solución de tinción (Ácido acético 0.5%, metanol 20%, Coomassie blue R-250 0.1% p/v) en baño maría a 90 °C. Luego se lavó el gel incubándolo sucesivas veces en solución desteñidora (Ácido acético 0.5%, metanol 20%) en baño maría a 90 °C hasta obtener un fondo claro.

Tinción de SDS-PAGE con nitrato de plata

Una vez finalizada la corrida se fijó el gel incubándolo 2 horas en solución fijadora (50% metanol, 12% ácido acético, 0.05% formalina). Luego se lo lavó 3 veces en etanol 35% por 20 minutos cada vez y se lo sensibilizó incubándolo en una solución de tiosulfato de sodio 0.02% por 2 minutos. Se lavó el gel en agua 3 veces por 5 minutos y se tiñó con solución de tinción (nitrato de plata 0.2%, formalina 0.076%) por 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavó en agua por un minuto, dos veces, y se reveló incubándolo en solución de revelado (6% carbonato de sodio, 0.05% formalina, 0.0004%). Tras la aparición del color deseado se frenó la reacción de revelado incubando el gel en solución 50% metanol, 12% ácido acético.

Purificación de tubulina empobrecida del isotipo acetilado

Se homogenizaron cerebros de ratas Wistar adultas en 1.5 volúmenes de buffer MEM [100 mM MES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF y 1 mM fenantrolina, llevado a pH 6,7 con NaOH] frío (baño de hielo) y se centrifugó a en frío (100 000 g por 30 minutos a 4 °C). A la fracción sobrenadante (SN₁) se la suplementó con glicerol (40% v/v concentración final) y se la incubó a 37 °C por 30 minutos y se la centrifugó en caliente (100 000 g por 30 minutos a 27 °C). Se descartó el sobrenadante (SN₂) y al precipitado (P₂) se lo resuspendió en buffer MEM frío (1/5 del volumen del SN₁ sin glicerol). Se lo mantuvo en baño de hielo por media hora y se lo centrifugó en frío (100 000 g por 30 minutos a 4 °C). Se tomó el sobrenadante (SN₃, tubulina purificada por un ciclo; PMT(x1)), se le agregó GTP (concentración final 0.3 mM) y glicerol (concentración final 40% v/v), se lo incubó durante 30 minutos a 37 °C y se lo centrifugó en caliente. Se descartó el sobrenadante (SN₄) y se resuspendió el precipitado (P₄) en buffer MEM frío con ATP 1.5 mM. Se lo mantuvo en baño de hielo por 30 minutos y se lo centrifugó en frío. El sobrenadante (SN₅, proteínas de microtúbulos purificada por 2 ciclos; PMT(x2)) fue tratado de la misma manera que el SN₃ para obtener el SN₇ (proteínas de microtúbulos purificadas por 3 ciclos).

Purificación de tubulina enriquecida en el isotipo acetilado

Cerebros de ratas Wistar fueron homogenizados y procesados para obtener tubulina purificada por 3 ciclos como descripto arriba con la modificación de que el buffer de

homogenización contenía TSA 6 μM y el resto de los buffers TSA 1 μM .

Para los experimentos de comparación entre muestras enriquecidas y empobrecidas en tubulina acetilada se dividieron los cerebros en dos (hemisferio izquierdo y derecho) y se tomó un hemisferio de cada cerebro (aleatoriamente) para hacer cada una de las preparaciones (enriquecida o empobrecida), de manera tal que ambas preparaciones fueran comparables.

Purificación de tubulina por columna de fosfocelulosa

Se hidrató por 30 minutos la fosfocelulosa utilizando 50 ml de agua destilada por cada gramo de resina. Mientras se hidrataba la resina se extrajo el polvo fino en suspensión. Luego de hidratar y decantar la resina, el agua fue eliminada y a la resina sedimentada se le agregó hidróxido de sodio 2 M en una relación 3:1 de volumen (gel:hidróxido). Luego de 5 minutos se filtró la resina utilizando un embudo büchner, se la enjuagó con abundante agua y se la incubó con una solución de ácido clorhídrico 2 M por 5 minutos. Se la filtró nuevamente, se enjuagó con abundante agua destilada hasta lograr un pH de 5-5.5 y luego se utilizó esta resina para armar la columna (se utilizaron aproximadamente 8 ml de resina por cada mililitro de SN_3). Se la equilibró con 5 volúmenes de buffer MEM \pm TSA 0.5 μM según se tratara de purificar tubulina acetilada o no acetilada y luego se sembró la muestra (SN_3). Se recogieron las fracciones de SN_3 que eluyeron de la columna, las cuales constituyen la muestra de tubulina purificada (sin MAPs). Las MAPs por ser proteínas de naturaleza básica quedan retenidas en la columna mientras que la tubulina, que es ácida no.

Ensayos de turbidimetría

La polimerización/depolicimerización de tubulina fue seguida midiendo la absorbancia de la solución a 350 nm. Se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ un SN_3 (2,5 mg de proteína/ml) adicionado con GTP 0.5 mM (concentración final). Se utilizó un espectrofotómetro termostatzado (modelo UV-2401PC; Shimadzu). Se midió la absorbancia cada 30 segundos.

Inmunopurificación de tubulina acetilada

El anticuerpo 6-11B-1 anti tubulina acetilada fue unido a esferas de Sepharose-proteína G (100 μg de 6-11B-1 por cada 200 μl de Sepharose-Proteína G) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de lavar la resina unida al anticuerpo, esta fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente con un SN_5 enriquecido en tubulina acetilada (600 μl , 1,5 mg de proteína/ml) y luego lavada 5 veces con 10 volúmenes de cama de PBS suplementado con Triton X-100 al 0.5%. Las proteínas unidas fueron eluidas dos veces con 400 μl de buffer de elución (fosfato 100 mM llevado a pH 12 con NaOH, TSA 9 μM) por 5 minutos con agitación suave a temperatura ambiente. Las dos eluciones fueron combinadas y guardadas a -20 $^{\circ}\text{C}$. Como control se incubó la Sepharose unida al anticuerpo con un SN_5 empobrecido de tubulina acetilada y se lo procesó en paralelo como ya descrito.

Cuantificación del porcentaje de tubulina acetilada en muestras enriquecidas en el isotipo acetilado

Se analizó el contenido de α -tubulina por Western blot de diferentes cantidades de la muestra a analizar (SN_1 , SN_3 , etc.) y de tubulina acetilada inmunopurificada (estándar). Se eligieron cantidades de cada muestra que contuvieran igual cantidad de tubulina total y se analizaron nuevamente por Western blot pero esta vez revelado con anti tubulina acetilada. Se calculó el porcentaje de tubulina acetilada respecto de tubulina total como la densidad óptica (DO) de la banda de tubulina acetilada de la muestra problema dividido la DO de la banda de tubulina acetilada del estándar, multiplicado por cien.

Cuantificación del porcentaje de tubulina acetilada en muestras empobrecidas en el isotipo acetilado

Se prepararon dos SN_3 uno enriquecido en tubulina acetilada y otro empobrecido y se igualó su concentración proteica. El enriquecido se utilizó como estándar, asumiendo que contiene un 64% de tubulina acetilada según mediciones previas (de otros SN_3). Se mezclaron ambos sobrenadantes, manteniendo constante el volumen final de mezcla, de manera tal que el porcentaje de tubulina acetilada del SN_3 empobrecido aumentara en 0, 0.2, 0.4 o 0.8 unidades porcentuales. Se analizaron las mezclas por Western blot con el anticuerpo anti tubulina acetilada y se graficó la densidad óptica de la banda en función del porcentaje de tubulina acetilada agregado. Se determinó pendiente y la ordenada al origen del gráfico mediante regresión lineal y se calculó la concentración de tubulina acetilada en el SN_3 empobrecido como la relación entre la ordenada al origen y la pendiente. Para asignarle un error a esta medición se sumaron los errores relativos de los datos de origen: 0.15 para el valor del porcentaje de tubulina acetilada del SN_3 enriquecido, 0.326 para el valor de la ordenada al origen y 0.13 para el valor de la pendiente. Esto da un error relativo total de 0.6. El error absoluto de una medición es el producto del error relativo por el valor de la misma, lo que daría en el caso del porcentaje de tubulina acetilada en SN_3 un error del 0.11%.

Microscopía de Inmunofluorescencia

Las células fueron crecidas sobre un cubreobjeto y fijadas con metanol anhidro a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos. Se lavaron con PBS, se incubaron con albúmina sérica bovina solubilizada en PBS (5% p/v) por una hora y luego se incubaron con el anticuerpo primario (anti tubulina acetilada, clon 6-11B-1, dilución 1:1000 en PBS con albúmina al 1% p/v) por 4 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$. Se lavaron las células 3 veces con PBS y se incubaron 1 hora con el anticuerpo secundario (anti IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor [®]488). Se lavaron 3 veces con PBS otra vez y se montaron los cubreobjetos sobre FluorSave. Las imágenes fueron colectadas usando un microscopio confocal espectral FV1000 Olympus (Olympus Latin America, Miami, FL, USA) equipado con un láser argón/helio/neón a la longitud de onda correspondiente usando el software (Olympus FV Viewer) provisto por el fabricante y procesadas utilizando el programa Image J 1.46r (Wayne Rasband; NIH, USA).

Acetilación química de tubulina

En preparaciones parcialmente purificadas: A una muestra de 100 μl de SN₁ (15 mg de proteína/ml) o de SN₃ (2-4 mg de proteína/ml) se le agregó 125 μl de ácido bórico (500 mM, pH 9) y luego 50 μl de anhídrido acético frío al 1% v/v recién preparado, o de agua. Se incubó la mezcla a 4 °C por 20 minutos y luego se le agregó 100 μl de buffer de muestra Laemmli (5x, concentrada 5 veces). Las muestras fueron re-diluidas con buffer de muestra Laemmli 1x para obtener concentraciones de tubulina adecuadas para Western blot. Se analizó el contenido de tubulina acetilada de ambas muestras por Western blot. Se sembraron 2 cantidades (1x y 2x) por triplicado de cada muestra.

En cultivos celulares: Células crecidas a 80% de confluencia en un disco de cultivo de 10 cm de diámetro fueron lavadas con PBS a 37 °C y recolectadas luego en 2 ml de buffer de extracción (ácido bórico 280 mM pH 9, SDS 1%, TSA 3 μM , PMSF 1 mM y EGTA 1 mM). El extracto de células fue sonicado (3 x 30 segundos, en sonicador Parmer Ultrasonic Homogenizer) y luego centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 15 °C. Se recolectó el sobrenadante y se dividió en dos alícuotas de 900 μl cada una. A una fracción se le agregaron 110 μl de anhídrido acético 2% v/v recién preparado y a la otra se le agregaron 110 μl de agua. Ambas alícuotas se mantuvieron a 4 °C por 20 minutos y luego se precipitaron sus proteínas con metanol-cloroformo (ver abajo). El precipitado de proteínas se resuspendió en 300 μl de buffer de muestra Laemmli y se lo sonicó 3 veces por 30 segundos. Se analizó el contenido de tubulina acetilada de ambas muestras por Western blot. Se sembraron 2 cantidades (1X y 2X) por triplicado de cada muestra.

Precipitación de proteínas con metanol-cloroformo

Se utilizó el método descrito por Folch et al. (1957). Brevemente, se mezcló un volumen de solución acuosa de proteínas con 1.25 volúmenes de metanol-cloroformo (4:1) y se agitó con Vortex por aproximadamente 30 segundos. La mezcla se centrifugó a 10.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente y se descartó la fase superior con cuidado de no remover la interfase. Se agregó metanol (0.75 volúmenes respecto del volumen acuoso original) y se centrifugó a 10 000 g por 30 minutos a temperatura ambiente. Se removió el solvente y se dejó secar el precipitado, el cual fue resuspendido y sonicado en buffer de muestra Laemmli.

Medición de la concentración de proteínas totales

Se midió el contenido de proteínas de las muestras utilizando el método de Bradford (1976) utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Preparación de membranas disueltas en detergente

A menos que se especifique lo contrario, todo el proceso fue realizado a 4 °C. Se homogenizó un cerebro de rata en buffer de homogenización 10:1 p/v (Tris/HCl 10 mM, pH 7.4, sacarosa 0.32 M, PMSF 0.5 mM) y se centrifugó 10 minutos a 10.000 x g. Se tomó el sobrenadante y se le adicionó cloruro de sodio 2 M concentración final. Se sonicó 3 veces en nivel de potencia 5 por 10 segundos en un sonicador Cole-Parmer serie 4710 y se lo incubó 30 minutos en baño de

hielo. Se centrifugó 30 minutos a 100.000 x g y se descartó el sobrenadante. El precipitado, el cual se denomina como primer precipitado de membranas, fue resuspendido (utilizando un homogenizador) en 5 ml de buffer MEM-PMSF (buffer MEM conteniendo PMSF 0.5 mM). Se centrifugó a 100.000 x g por 30 minutos y al precipitado resultante se lo resuspendió en 500 µl de buffer MEM-PMSF (concentración de proteínas ≈ 4 mg/ml). Esta preparación se guardó a -70 °C hasta el día del experimento de coprecipitación (máximo una semana más tarde), en el cual se le agregó triton X-100 a concentración final 1% v/v con el fin de extraer las proteínas de membrana. Se lo incubó por 30 minutos en baño de hielo y se lo centrifugó a 100.000 x g por 30 minutos. Se utilizó el sobrenadante resultante, el cual se denomina como membranas disueltas en detergente.

Membranas pretratadas: en el caso de que se hubieran utilizado membranas pretratadas con etanol y calcio calmodulina (coprecipitación con tubulina enriquecida o empobrecida del isotipo acetilado), las mismas fueron preparadas de la siguiente manera. Se resuspendió el primer precipitado de membranas (utilizando un homogenizador) en buffer MEM-PMSF adicionado con calcio 5 mM, calmodulina 400 nM y etanol 0.6% v/v. Se incubó 15 minutos a 37 °C y se centrifugó a 100.000 x g por 20 minutos. Se resuspendió el precipitado (utilizando un homogenizador) en 5 ml de buffer MEM-PMSF, se centrifugó nuevamente a 100.000 x g por 20 minutos y se resuspendió el precipitado en 500 µl de buffer MEM-PMSF. Esta preparación se guardó a -70 °C hasta el día del experimento (máximo una semana más tarde), en el cual se extrajeron las proteínas de membrana. Para ello se le agregó Triton X-100 a concentración final 1% v/v, se lo incubó por 30 minutos en baño de hielo y se lo centrifugó a 100.000 x g por 30 minutos. Se utilizó el sobrenadante resultante, el cual se denomina como membranas pretratadas disueltas en detergente

Coprecipitación de PMCA con microtúbulos

A 200 µl de una preparación de proteínas de microtúbulos de un ciclo (SN₃, concentración de proteínas ≈3.5 mg/ml) se le adicionó taxol 100 µM, GTP 0.5 mM, luego 40 µl de membranas disueltas en detergente. Todo el procedimiento fue realizado en baño de hielo. Posteriormente se incubó la mezcla por 25 minutos a 37 °C y se centrifugó a 100.000 x g a 4 °C por 15 minutos. Se recogió el sobrenadante al cual se le agregaron 0.2 volúmenes de buffer de muestra Laemmli 5x. El precipitado fue resuspendido en un volumen equivalente de buffer de muestra Laemmli 1x. Se analizó el contenido de tubulina y PMCA mediante Western blot.

Coprecipitación de PMCA con microtúbulos preensamblados

A una alícuota de 200 µl de una preparación de proteínas de microtúbulos purificada por un ciclo enriquecida en tubulina acetilada (SN₃, concentración de proteínas ≈3.5 mg/ml) se le agregó taxol 100 µM y GTP 0.5 mM y se la incubó 25 minutos a 37 °C. A otra alícuota del mismo volumen se la mantuvo en baño de hielo y se le agregó taxol 100 µM y GTP 0.5 mM justo antes de que se cumplan los 25 minutos de incubación de la otra alícuota. Luego se les agregó 40 µl de membranas disueltas en detergente (a la segunda alícuota mientras estaba todavía en frío) y se procesaron como en el experimento de coprecipitación descrito arriba.

REFERENCIAS

Ageta-Ishihara, N., Miyata, T., Ohshima, C., Watanabe, M., Sato, Y., Hamamura, Y., Higashiyama, T., Mazitschek, R., Bito, H., and Kinoshita, M. (2013). Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation. *Nat. Commun.* 4, 2532.

Akella, J.S., Wloga, D., Kim, J., Starostina, N.G., Lyons-Abbott, S., Morrissette, N.S., Dougan, S.T., Kipreos, E.T., and Gaertig, J. (2010). MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature* 467, 218–222.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* (New York: Garland Science).

Alonso, A.C., Nunez-Fernandez, M., Beltramo, D.M., Casale, C.H., and Barra, H.S. (1998). Na⁺,K⁺-ATPase was found to be the membrane component responsible for the hydrophobic behavior of the brain membrane tubulin. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 824–827.

Aoyagi, S., and Archer, T.K. (2005). Modulating molecular chaperone Hsp90 functions through reversible acetylation. *Trends Cell Biol.* 15, 565–567.

Arce, C.A., and Barra, H.S. (1985). Release of C-terminal tyrosine from tubulin and microtubules at steady state. *Biochem. J.* 226, 311–317.

Arce, C.A., Barra, H.S., Rodriguez, J.A., and Caputto, R. (1975). Tentative identification of the amino acid that binds tyrosine as a single unit into a soluble brain protein. *FEBS Lett.* 50, 5–7.

Arce, C.A., Hallak, M.E., Rodriguez, J.A., Barra, H.S., and Caputio, R. (1978). Capability of Tubulin and Microtubules to Incorporate and to Release Tyrosine and Phenylalanine and the Effect of the Incorporation of These Amino Acids on Tubulin Assembly. *J. Neurochem.* 31, 205–210.

Argaraña, C.E., Arce, C.A., Barra, H.S., and Caputto, R. (1977). In vivo incorporation of [¹⁴C]tyrosine into the C-terminal position of the alpha subunit of tubulin. *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 264–268.

Asthana, J., Kapoor, S., Mohan, R., and Panda, D. (2013). Inhibition of HDAC6 deacetylase activity increases its binding with microtubules and suppresses microtubule dynamic instability in MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* 288, 22516–22526.

Audebert, S., Desbruyères, E., Gruszczynski, C., Koulakoff, A., Gros, F., Denoulet, P., and Eddé, B. (1993). Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons. *Mol. Biol. Cell* 4, 615–626.

Audebert, S., Koulakoff, A., Berwald-Netter, Y., Gros, F., Denoulet, P., and Eddé, B. (1994). Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 8), 2313–2322.

Azuma, K., Horie, K., Inoue, S., Ouchi, Y., and Sakai, R. (2004). Analysis of estrogen receptor alpha signaling complex at the plasma membrane. *FEBS Lett.* 577, 339–344.

Baas, P.W., and Black, M.M. (1990). Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability. *J. Cell Biol.* 111, 495–509.

Baas, P.W., and Mozgova, O.I. (2012). A novel role for retrograde transport of microtubules in the axon. *Cytoskeleton.* Hoboken NJ 69, 416–425.



Bader, M. (1980). A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. *J. Chem. Educ.* 57, 703.

Badin-Larcon, A.C., Boscheron, C., Soleilhac, J.M., Piel, M., Mann, C., Denarier, E., Fourest-Lieuvain, A., Lafanechere, L., Bornens, M., and Job, D. (2004). Suppression of nuclear oscillations in *Saccharomyces cerevisiae* expressing Glu tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5577–5582.

Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., et al. (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 280, 26729–26734.

Barra, H.S., Rodriguez, J.A., Arce, C.A., and Caputto, R. (1973). A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins (14 C)arginine by a ribonuclease-sensitive system and (14 C)tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *J. Neurochem.* 20, 97–108.

Barra, H.S., Arce, C.A., Rodríguez, J.A., and Caputto, R. (1974). Some common properties of the protein that incorporates tyrosine as a single unit and the microtubule proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1384–1390.

Beirowski, B., Gustin, J., Armour, S.M., Yamamoto, H., Viader, A., North, B.J., Michán, S., Baloh, R.H., Golden, J.P., Schmidt, R.E., et al. (2011). Sir-two-homolog 2 (Sirt2) modulates peripheral myelination through polarity protein Par-3/atypical protein kinase C (aPKC) signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E952–961.

Benaim, G., Cervino, V., Lopez-Estraño, C., and Weitzman, C. (1994). Ethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1195, 141–148.

Benetti, F., Mičetić, I., Carsughi, F., Spinozzi, F., Bubacco, L., and Beltramini, M. (2011). Insights into the oligomerization process of the C-terminal domain of human plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 506, 194–200.

Berberi, N.F., O'Connor, A.K., Haycraft, C.J., and Yoder, B.K. (2009). The Primary Cilium as a Complex Signaling Center. *Curr. Biol.* 19, R526–R535.

Berkowitz, S.A., and Wolff, J. (1981). Intrinsic calcium sensitivity of tubulin polymerization. The contributions of temperature, tubulin concentration, and associated proteins. *J. Biol. Chem.* 256, 11216–11223.

Bertos, N.R., Gilquin, B., Chan, G.K.T., Yen, T.J., Khochbin, S., and Yang, X.-J. (2004). Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J. Biol. Chem.* 279, 48246–48254.

Beurel, E. (2011). HDAC6 regulates LPS-tolerance in astrocytes. *PLoS One* 6, e25804.

Billger, M., Strömberg, E., and Wallin, M. (1991). Microtubule-associated proteins-dependent colchicine stability of acetylated cold-labile brain microtubules from the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J. Cell Biol.* 113, 331–338.

Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* 94, 235–263.

Bobinsec, Y., Moudjou, M., Fouquet, J.P., Desbruyères, E., Eddé, B., and Bornens, M. (1998).

Glutamylolation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 39, 223–232.

Bobrowska, A., Paganetti, P., Matthias, P., and Bates, G.P. (2011). Hdac6 knock-out increases tubulin acetylation but does not modify disease progression in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* 6, e20696.

Bobrowska, A., Donmez, G., Weiss, A., Guarente, L., and Bates, G. (2012). SIRT2 ablation has no effect on tubulin acetylation in brain, cholesterol biosynthesis or the progression of Huntington's disease phenotypes in vivo. *PLoS One* 7, e34805.

Bonner, M.K., Poole, D.S., Xu, T., Sarkeshik, A., Yates, J.R., 3rd, and Skop, A.R. (2011). Mitotic spindle proteomics in Chinese hamster ovary cells. *PLoS One* 6, e20489.

Bosch Grau, M., Gonzalez Curto, G., Rocha, C., Magiera, M.M., Marques Sousa, P., Giordano, T., Spassky, N., and Janke, C. (2013). Tubulin glycyloses and glutamylases have distinct functions in stabilization and motility of ependymal cilia. *J. Cell Biol.* 202, 441–451.

Bouchet-Marquis, C., Zuber, B., Glynn, A.-M., Eltsov, M., Grabenbauer, M., Goldie, K.N., Thomas, D., Frangakis, A.S., Dubochet, J., and Chrétien, D. (2007). Visualization of cell microtubules in their native state. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 99, 45–53.

Boyault, C., Gilquin, B., Zhang, Y., Rybin, V., Garman, E., Meyer-Klaucke, W., Matthias, P., Müller, C.W., and Khochbin, S. (2006). HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *EMBO J.* 25, 3357–3366.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.

Bradner, J.E., West, N., Grachan, M.L., Greenberg, E.F., Haggarty, S.J., Warnow, T., and Mazitschek, R. (2010). Chemical phylogenetics of histone deacetylases. *Nat Chem Biol* 6, 238–243.

Bray, D., and Bunge, M.B. (1981). Serial analysis of microtubules in cultured rat sensory axons. *J. Neurocytol.* 10, 589–605.

Bré, M.H., de Néchaud, B., Wolff, A., and Fleury, A. (1994). Glutamylated tubulin probed in ciliates with the monoclonal antibody GT335. *Cell Motil. Cytoskeleton* 27, 337–349.

Bré, M.H., Redeker, V., Quibell, M., Darmanaden-Delorme, J., Bressac, C., Cosson, J., Huitorel, P., Schmitter, J.M., Rossler, J., Johnson, T., et al. (1996). Axonemal tubulin polyglycylation probed with two monoclonal antibodies: widespread evolutionary distribution, appearance during spermatozoan maturation and possible function in motility. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 4), 727–738.

Breitling, F., and Little, M. (1986). Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules. Epitope locations of YOL1/34, DM1A and DM1B. *J. Mol. Biol.* 189, 367–370.

Broide, R.S., Redwine, J.M., Aftahi, N., Young, W., Bloom, F.E., and Winrow, C.J. (2007). Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain. *J. Mol. Neurosci.* MN 31, 47–58.

Bryantseva, S.A., and Zhapparova, O.N. (2012). Bidirectional transport of organelles: unity and struggle of opposing motors. *Cell Biol. Int.* 36, 1–6.

Burakov, A., Nadezhdina, E., Slepchenko, B., and Rodionov, V. (2003). Centrosome positioning in interphase cells. *J. Cell Biol.* 162, 963–969.

- Burton, P.R., Hinkley, R.E., and Pierson, G.B. (1975). Tannic acid-stained microtubules with 12, 13, and 15 protofilaments. *J. Cell Biol.* 65, 227–233.
- Cai, D., McEwen, D.P., Martens, J.R., Meyhofer, E., and Verhey, K.J. (2009). Single Molecule Imaging Reveals Differences in Microtubule Track Selection Between Kinesin Motors. *PLoS Biol* 7, e1000216.
- Campbell, P.K., Waymire, K.G., Heier, R.L., Sharer, C., Day, D.E., Reimann, H., Jaje, J.M., Friedrich, G.A., Burmeister, M., Bartness, T.J., et al. (2002). Mutation of a novel gene results in abnormal development of spermatid flagella, loss of intermale aggression and reduced body fat in mice. *Genetics* 162, 307–320.
- Campetelli, A.N., Previtali, G., Arce, C.A., Barra, H.S., and Casale, C.H. (2005). Activation of the plasma membrane H-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by glucose is mediated by dissociation of the H(+)-ATPase-acetylated tubulin complex. *FEBS J.* 272, 5742–5752.
- Cao, L., Ding, X., Yu, W., Yang, X., Shen, S., and Yu, L. (2007). Phylogenetic and evolutionary analysis of the septin protein family in metazoan. *FEBS Lett.* 581, 5526–5532.
- Carafoli, E. (2002). Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1115–1122.
- Carafoli, E. (2010). The fateful encounter of mitochondria with calcium: how did it happen? *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 595–606.
- Carbajal, A., Chesta, M.E., Bisig, C.G., and Arce, C.A. (2012). A novel method for purification of polymerizable tubulin with a high content of the acetylated isotype. *Biochem J.*
- Caron, J.M., Jones, A.L., and Kirschner, M.W. (1985). Autoregulation of tubulin synthesis in hepatocytes and fibroblasts. *J. Cell Biol.* 101, 1763–1772.
- Casale, C.H., Alonso, A.D., and Barra, H.S. (2001). Brain plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase is inhibited by acetylated tubulin. *Mol Cell Biochem* 216, 85–92.
- Castoldi, M., and Popov, A.V. (2003). Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif.* 32, 83–88.
- Castro-Castro, A., Janke, C., Montagnac, G., Paul-Gilloteaux, P., and Chavrier, P. (2012). ATAT1/MEC-17 acetyltransferase and HDAC6 deacetylase control a balance of acetylation of alpha-tubulin and cortactin and regulate MT1-MMP trafficking and breast tumor cell invasion. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 950–960.
- Chalfie, M., and Thomson, J.N. (1982). Structural and functional diversity in the neuronal microtubules of *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 93, 15–23.
- Chen, P.B., Hung, J.-H., Hickman, T.L., Coles, A.H., Carey, J.F., Weng, Z., Chu, F., and Fazio, T.G. (2013). Hdac6 regulates Tip60-p400 function in stem cells. *eLife* 2, e01557.
- Chesta, M.E., Carbajal, A., Bisig, C.G., and Arce, C.A. (2013). Quantification of acetylated tubulin. Cytoskeleton. *Hoboken NJ* 70, 297–303.
- Chevallet, M., Luche, S., and Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat. Protoc.* 1, 1852–1858.

- Chial, H.J., Thompson, H.B., and Splittgerber, A.G. (1993). A Spectral Study of the Charge Forms of Coomassie Blue G. *Anal. Biochem.* 209, 258–266.
- Cho, Y., and Cavalli, V. (2012). HDAC5 is a novel injury-regulated tubulin deacetylase controlling axon regeneration. *EMBO J.* 31, 3063–3078.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834–840.
- Chu, D.T., and Klymkowsky, M.W. (1989). The appearance of acetylated alpha-tubulin during early development and cellular differentiation in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 136, 104–117.
- Chu, C.-W., Hou, F., Zhang, J., Phu, L., Loktev, A.V., Kirkpatrick, D.S., Jackson, P.K., Zhao, Y., and Zou, H. (2011). A novel acetylation of β -tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Mol. Biol. Cell* 22, 448–456.
- Cleveland, D.W., Lopata, M.A., Sherline, P., and Kirschner, M.W. (1981). Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNAs. *Cell* 25, 537–546.
- Cleveland, D.W., Pittenger, M.F., and Feramisco, J.R. (1983). Elevation of tubulin levels by microinjection suppresses new tubulin synthesis. *Nature* 305, 738–740.
- Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., and Eisenman, R.N. (2010). Myc-nick: A cytoplasmic cleavage product of Myc that promotes α -tubulin acetylation and cell differentiation. *Cell* 142, 480–493.
- Conde, C., and Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 319–332.
- Cook, C., Gendron, T.F., Scheffel, K., Carlomagno, Y., Dunmore, J., DeTure, M., and Petrucelli, L. (2012). Loss of HDAC6, a novel CHIP substrate, alleviates abnormal tau accumulation. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2936–2945.
- Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., et al. (2009). Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* 136, 551–564.
- Cueva, J.G., Hsin, J., Huang, K.C., and Goodman, M.B. (2012). Posttranslational acetylation of α -tubulin constrains protofilament number in native microtubules. *Curr. Biol. CB* 22, 1066–1074.
- Van Damme, P., Arnesen, T., and Gevaert, K. (2011). Protein alpha-N-acetylation studied by N-terminomics. *FEBS J.* 278, 3822–3834.
- Dehmelt, L., and Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 6, 204.
- Derry, W.B., Wilson, L., Khan, I.A., Luduena, R.F., and Jordan, M.A. (1997). Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 3554–3562.
- Destaing, O., Saltel, F., Gilquin, B., Chabadel, A., Khochbin, S., Ory, S., and Jurdic, P. (2005). A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *J. Cell Sci.* 118, 2901–2911.

Díaz, J.F., Barasoain, I., and Andreu, J.M. (2003). Fast Kinetics of Taxol Binding to Microtubules EFFECTS OF SOLUTION VARIABLES AND MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEINS. *J. Biol. Chem.* 278, 8407–8419.

Van Dijk, J., Rogowski, K., Miro, J., Lacroix, B., Eddé, B., and Janke, C. (2007). A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation. *Mol. Cell* 26, 437–448.

Van Dijk, J., Miro, J., Strub, J.-M., Lacroix, B., van Dorselaer, A., Edde, B., and Janke, C. (2008). Polyglutamylation is a post-translational modification with a broad range of substrates. *J. Biol. Chem.* 283, 3915–3922.

Ding, H., Dolan, P.J., and Johnson, G.V.W. (2008). Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J. Neurochem.* 106, 2119–2130.

Dobashi, Y., Watanabe, Y., Miwa, C., Suzuki, S., and Koyama, S. (2011). Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 4, 476–495.

Dompierre, J.P., Godin, J.D., Charrin, B.C., Cordelieres, F.P., King, S.J., Humbert, S., and Saudou, F. (2007). Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 27, 3571–3583.

Dunn, G.A. (2000). Olympus/Nature competition: A 1, 2, 3 in light microscopy. *Nature* 408, 423–424.

Dunn, S., Morrison, E.E., Liverpool, T.B., Molina-París, C., Cross, R.A., Alonso, M.C., and Peckham, M. (2008). Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J. Cell Sci.* 121, 1085–1095.

Enyedi, A., Flura, M., Sarkadi, B., Gardos, G., and Carafoli, E. (1987). The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *J. Biol. Chem.* 262, 6425–6430.

Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A.D., Vernet, M., Schweitzer, A., Saoudi, Y., Pointu, H., Bosc, C., et al. (2005). A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7853–7858.

Erdozain, A.M., Morentin, B., Bedford, L., King, E., Tooth, D., Brewer, C., Wayne, D., Johnson, L., Gerdes, H.K., Wigmore, P., et al. (2014). Alcohol-related brain damage in humans. *PloS One* 9, e93586.

Eriksson, J.E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H.-M., and Goldman, R.D. (2009). Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J. Clin. Invest.* 119, 1763–1771.

Espallergues, J., Teegarden, S.L., Veerakumar, A., Boulden, J., Challis, C., Jochems, J., Chan, M., Petersen, T., Deneris, E., Matthias, P., et al. (2012). HDAC6 regulates glucocorticoid receptor signaling in serotonin pathways with a critical impact on stress resilience. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 4400–4416.

Falchetto, R., Vorherr, T., Brunner, J., and Carafoli, E. (1991). The plasma membrane Ca²⁺ pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 266, 2930–2936.

Falchetto, R., Vorherr, T., and Carafoli, E. (1992). The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca²⁺ pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci. Publ.*

Protein Soc. 1, 1613–1621.

Fernandez-Gonzalez, A., La Spada, A.R., Treadaway, J., Higdon, J.C., Harris, B.S., Sidman, R.L., Morgan, J.I., and Zuo, J. (2002). Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, *Nna1*. *Science* 295, 1904–1906.

Ferreira, A., and Cáceres, A. (1989). The expression of acetylated microtubules during axonal and dendritic growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 49, 205–213.

Fishel, E.A., and Dixit, R. (2013). Role of nucleation in cortical microtubule array organization: variations on a theme. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 75, 270–277.

FOLCH, J., LEES, M., and SLOANE STANLEY, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.

Fourniol, F., Perderiset, M., Houdusse, A., and Moores, C. (2013). Structural studies of the doublecortin family of MAPs. *Methods Cell Biol.* 115, 27–48.

Fourniol, F.J., Sindelar, C.V., Amigues, B., Clare, D.K., Thomas, G., Perderiset, M., Francis, F., Houdusse, A., and Moores, C.A. (2010). Template-free 13-protofilament microtubule-MAP assembly visualized at 8 Å resolution. *J. Cell Biol.* 191, 463–470.

Friedmann, D.R., Aguilar, A., Fan, J., Nachury, M.V., and Marmorstein, R. (2012). Structure of the α -tubulin acetyltransferase, α TAT1, and implications for tubulin-specific acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 19655–19660.

Friel, C.T., and Howard, J. (2011). The kinesin-13 MCAK has an unconventional ATPase cycle adapted for microtubule depolymerization. *EMBO J.* 30, 3928–3939.

Fujimoto, H., Higuchi, M., Koike, M., Ode, H., Pinak, M., Bunta, J.K., Nemoto, T., Sakudoh, T., Honda, N., Maekawa, H., et al. (2012). A possible overestimation of the effect of acetylation on lysine residues in KQ mutant analysis. *J. Comput. Chem.* 33, 239–246.

Fukada, M., Hanai, A., Nakayama, A., Suzuki, T., Miyata, N., Rodriguiz, R.M., Wetsel, W.C., Yao, T.P., and Kawaguchi, Y. (2012). Loss of deacetylation activity of Hdac6 affects emotional behavior in mice. *PLoS One* 7, e30924.

Di Fulvio, S., Azakir, B.A., Therrien, C., and Sinnreich, M. (2011). Dysferlin interacts with histone deacetylase 6 and increases alpha-tubulin acetylation. *PloS One* 6, e28563.

Fusco, C., Micale, L., Augello, B., Mandriani, B., Pellico, M.T., De Nittis, P., Calcagni, A., Monti, M., Cozzolino, F., Pucci, P., et al. (2014). HDAC6 mediates the acetylation of TRIM50. *Cell. Signal.* 26, 363–369.

Gaertig, J., Cruz, M.A., Bowen, J., Gu, L., Pennock, D.G., and Gorovsky, M.A. (1995). Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*. *J. Cell Biol.* 129, 1301–1310.

Gao, Y., Hubbert, C.C., Lu, J., Lee, Y.-S., Lee, J.-Y., and Yao, T.-P. (2007). Histone Deacetylase 6 Regulates Growth Factor-Induced Actin Remodeling and Endocytosis. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8637–8647.

Gard, D.L., and Kirschner, M.W. (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that

specifically promotes assembly at the plus-end. *J. Cell Biol.* 105, 2203–2215.

Garnham, C.P., and Roll-Mecak, A. (2012). The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskelet.* Hoboken NJ 69, 442–463.

Garvalov, B.K., Zuber, B., Bouchet-Marquis, C., Kudryashev, M., Gruska, M., Beck, M., Leis, A., Frischknecht, F., Bradke, F., Baumeister, W., et al. (2006). Luminal particles within cellular microtubules. *J. Cell Biol.* 174, 759–765.

Georgiou, C.D., Gfintzalis, K., Zervoudakis, G., and Papapostolou, I. (2008). Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 391–403.

Goswami, C. (2012). TRPV1-tubulin complex: involvement of membrane tubulin in the regulation of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J. Neurochem.* 123, 1–13.

Govindarajan, N., Rao, P., Burkhardt, S., Sananbenesi, F., Schluter, O.M., Bradke, F., Lu, J., and Fischer, A. (2013). Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 5, 52–63.

Grozinger, C.M., Hassig, C.A., and Schreiber, S.L. (1999). Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4868–4873.

Grozinger, C.M., Chao, E.D., Blackwell, H.E., Moazed, D., and Schreiber, S.L. (2001). Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J Biol Chem* 276, 38837–38843.

Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvain, A., Denarier, E., Pirollet, F., Lafanechère, L., and Job, D. (1998). STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J. Cell Biol.* 142, 167–179.

Gundersen, G.G., Khawaja, S., and Bulinski, J.C. (1987). Postpolymerization dephosphorylation of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. *J. Cell Biol.* 105, 251–264.

Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M., and Schreiber, S.L. (2003). Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U A* 100, 4389–4394.

Hallak, M.E., Rodriguez, J.A., Barra, H.S., and Caputto, R. (1977). Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett.* 73, 147–150.

Halpain, S., and Dehmelt, L. (2006). The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 7, 224.

Hammond, J.W., Huang, C.F., Kaech, S., Jacobson, C., Banker, G., and Verhey, K.J. (2010). Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Mol Biol Cell* 21, 572–583.

Heng, Y.-W., and Koh, C.-G. (2010). Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1622–1633.

- Herrmann, H., Strelkov, S.V., Burkhard, P., and Aebi, U. (2009). Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J. Clin. Invest.* 119, 1772–1783.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 682–696.
- Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68, 610–638.
- Hofmann, F., Anagli, J., Carafoli, E., and Vorherr, T. (1994). Phosphorylation of the calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca²⁺ pump by protein kinase C reduces its interaction with calmodulin and with its pump receptor site. *J. Biol. Chem.* 269, 24298–24303.
- Hook, S.S., Orian, A., Cowley, S.M., and Eisenman, R.N. (2002). Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13425–13430.
- Horwitz, S.B. (1994). Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 5 Suppl 6, S3–6.
- Howes, S.C., Alushin, G.M., Shida, T., Nachury, M.V., and Nogales, E. (2014). Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Mol. Biol. Cell* 25, 257–266.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., and Yao, T.P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455–458.
- Huo, L., Li, D., Sun, X., Shi, X., Karna, P., Yang, W., Liu, M., Qiao, W., Aneja, R., and Zhou, J. (2011). Regulation of Tat acetylation and transactivation activity by the microtubule-associated deacetylase HDAC6. *J. Biol. Chem.* 286, 9280–9286.
- Hyman, A.A., Chrétien, D., Arnal, I., and Wade, R.H. (1995). Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate. *J. Cell Biol.* 128, 117–125.
- Ikegami, K., Heier, R.L., Taruishi, M., Takagi, H., Mukai, M., Shimma, S., Taira, S., Hatanaka, K., Morone, N., Yao, I., et al. (2007). Loss of alpha-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3213–3218.
- Ikegami, K., Sato, S., Nakamura, K., Ostrowski, L.E., and Setou, M. (2010). Tubulin polyglutamylation is essential for airway ciliary function through the regulation of beating asymmetry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10490–10495.
- Iwata, A., Riley, B.E., Johnston, J.A., and Kopito, R.R. (2005). HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J. Biol. Chem.* 280, 40282–40292.
- Ja, S., S, Y., J, P., Ra, H., and Pj, C. (2002). Interaction between metabotropic glutamate receptor 7 and alpha tubulin., Interaction between metabotropic glutamate receptor 7 and alpha tubulin. *J. Neurochem. J. Neurochem.* 80, 980, 980–988.
- James, P., Vorherr, T., Krebs, J., Morelli, A., Castello, G., McCormick, D.J., Penniston, J.T., De Flora, A., and Carafoli, E. (1989). Modulation of erythrocyte Ca²⁺-ATPase by selective calpain cleavage of the calmodulin-binding domain. *J. Biol. Chem.* 264, 8289–8296.

James, P.H., Pruschy, M., Vorherr, T.E., Penniston, J.T., and Carafoli, E. (1989b). Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump. *Biochemistry (Mosc.)* 28, 4253–4258.

Jang, M.-H., Kim, J., Kalme, S., Han, J.-W., Yoo, H.-S., Kim, J., Koo, B., Kim, S.-K., and Yoon, M.-Y. (2008). Cloning, purification, and polymerization of *Capsicum annuum* recombinant alpha and beta tubulin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1048–1055.

Janke, C., and Bulinski, J.C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 773–786.

Jansen, R.-P., and Niessing, D. (2012). Assembly of mRNA-protein complexes for directional mRNA transport in eukaryotes—an overview. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 284–293.

Job, D., Rauch, C.T., Fischer, E.H., and Margolis, R.L. (1982). Recycling of cold-stable microtubules: evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks. *Biochemistry (Mosc.)* 21, 509–515.

Kalebic, N., Sorrentino, S., Perlas, E., Bolasco, G., Martinez, C., and Heppenstall, P.A. (2013a). alphaTAT1 is the major alpha-tubulin acetyltransferase in mice. *Nat Commun* 4, 1962.

Kalebic, N., Martinez, C., Perlas, E., Hublitz, P., Bilbao-Cortes, D., Fiedorczuk, K., Andolfo, A., and Heppenstall, P.A. (2013b). Tubulin acetyltransferase α TAT1 destabilizes microtubules independently of its acetylation activity. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1114–1123.

Kalinina, E., Biswas, R., Berezniuk, I., Hermoso, A., Aviles, F.X., and Fricker, L.D. (2007). A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 836–850.

Kaluza, D., Kroll, J., Gesierich, S., Yao, T.-P., Boon, R.A., Hergenreider, E., Tjwa, M., Rossig, L., Seto, E., Augustin, H.G., et al. (2011). Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. *EMBO J.* 30, 4142–4156.

Kar, S., Fan, J., Smith, M.J., Goedert, M., and Amos, L.A. (2003). Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J.* 22, 70–77.

Karr, T.L., Kristofferson, D., and Purich, D.L. (1980). Calcium ion induces endwise depolymerization of bovine brain microtubules. *J. Biol. Chem.* 255, 11853–11856.

Kato, C., Miyazaki, K., Nakagawa, A., Ohira, M., Nakamura, Y., Ozaki, T., Imai, T., and Nakagawara, A. (2004). Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 112, 365–375.

Kavallaris, M. (2010). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* 10, 194–204.

Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A., and Yao, T.P. (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115, 727–738.

Kellogg, D.R., Field, C.M., and Alberts, B.M. (1989). Identification of microtubule-associated proteins in the centrosome, spindle, and kinetochore of the early *Drosophila* embryo. *J. Cell Biol.* 109, 2977–2991.

- Khawaja, S., Gundersen, G.G., and Bulinski, J.C. (1988). Enhanced stability of microtubules enriched in deetyrosinated tubulin is not a direct function of deetyrosination level. *J. Cell Biol.* 106, 141–149.
- Kim, H. (1991). Depletion of acetylated alpha-tubulin during microtubule purification from bovine brain gray and white matter regions. *J. Neurosci. Res.* 30, 172–182.
- Kim, G.W., Li, L., Gorbani, M., You, L., and Yang, X.J. (2013). Mice Lacking alpha-Tubulin Acetyltransferase 1 Are Viable but Display alpha-Tubulin Acetylation Deficiency and Dentate Gyrus Distortion. *J Biol Chem* 288, 20334–20350.
- Kim, H.-S., Vassilopoulos, A., Wang, R.-H., Lahusen, T., Xiao, Z., Xu, X., Li, C., Veenstra, T.D., Li, B., Yu, H., et al. (2011). SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. *Cancer Cell* 20, 487–499.
- Kim, S.C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., et al. (2006). Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol. Cell* 23, 607–618.
- Kimura, Y., Kurabe, N., Ikegami, K., Tsutsumi, K., Konishi, Y., Kaplan, O.I., Kunitomo, H., Iino, Y., Blacque, O.E., and Setou, M. (2010). Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs). *J. Biol. Chem.* 285, 22936–22941.
- Kinoshita, K., Noetzel, T.L., Arnal, I., Drechsel, D.N., and Hyman, A.A. (2006). Global and local control of microtubule destabilization promoted by a catastrophe kinesin MCAK/XKCM1. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 27, 107–114.
- Kline-Smith, S.L., and Walczak, C.E. (2002). The microtubule-destabilizing kinesin XKCM1 regulates microtubule dynamic instability in cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 2718–2731.
- Kobayashi, T., and Dynlacht, B.D. (2011). Regulating the transition from centriole to basal body. *J. Cell Biol.* 193, 435–444.
- Konishi, Y., and Setou, M. (2009). Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat. Neurosci.* 12, 559–567.
- Konzack, S., Thies, E., Marx, A., Mandelkow, E.-M., and Mandelkow, E. (2007). Swimming against the tide: mobility of the microtubule-associated protein tau in neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 9916–9927.
- Kosk-Kosicka, D., and Bzdega, T. (1988). Activation of the erythrocyte Ca²⁺-ATPase by either self-association or interaction with calmodulin. *J. Biol. Chem.* 263, 18184–18189.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.
- Kovacs, J.J., Murphy, P.J.M., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.-T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B., and Yao, T.-P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol. Cell* 18, 601–607.
- Kozielski, F., Riaz, T., DeBonis, S., Koehler, C.J., Kroening, M., Panse, I., Strozynski, M., Donaldson, I.M., and Thiede, B. (2011). Proteome analysis of microtubule-associated proteins and their interacting partners from mammalian brain. *Amino Acids* 41, 363–385.

- Kreis, T.E. (1987). Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *EMBO J.* 6, 2597–2606.
- Kumar, N., and Flavin, M. (1981). Preferential action of a brain detyrosinating carboxypeptidase on polymerized tubulin. *J. Biol. Chem.* 256, 7678–7686.
- Kumar, P., and Wittmann, T. (2012). +TIPs: SxIPping along microtubule ends. *Trends Cell Biol.* 22, 418–428.
- L'Hernault, S.W., and Rosenbaum, J.L. (1985). Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry (Mosc.)* 24, 473–478.
- Lacroix, B., van Dijk, J., Gold, N.D., Guizetti, J., Aldrian-Herrada, G., Rogowski, K., Gerlich, D.W., and Janke, C. (2010). Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J. Cell Biol.* 189, 945–954.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lafanechère, L., Courtay-Cahen, C., Kawakami, T., Jacrot, M., Rüdiger, M., Wehland, J., Job, D., and Margolis, R.L. (1998). Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 2), 171–181.
- Lammers, M., Neumann, H., Chin, J.W., and James, L.C. (2010). Acetylation regulates cyclophilin A catalysis, immunosuppression and HIV isomerization. *Nat. Chem. Biol.* 6, 331–337.
- Lansbergen, G., Grigoriev, I., Mimori-Kiyosue, Y., Ohtsuka, T., Higa, S., Kitajima, I., Demmers, J., Galjart, N., Houtsmuller, A.B., Grosveld, F., et al. (2006). CLASPs attach microtubule plus ends to the cell cortex through a complex with LL5beta. *Dev. Cell* 11, 21–32.
- Lehtreck, K.F., and Geimer, S. (2000). Distribution of polyglutamylated tubulin in the flagellar apparatus of green flagellates. *Cell Motil. Cytoskeleton* 47, 219–235.
- Lee, S.H., and Dominguez, R. (2010). Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol. Cells* 29, 311–325.
- Lee, M.N., Koh, A., Park, D., Jang, J.-H., Kwak, D., Jeon, H., Kim, J., Choi, E.-J., Jeong, H., Suh, P.-G., et al. (2013). Deacetylated $\alpha\beta$ -tubulin acts as a positive regulator of Rheb GTPase through increasing its GTP-loading. *Cell. Signal.* 25, 539–551.
- Lehotzky, A., Telegdi, M., Liliom, K., and Ovádi, J. (1993). Interaction of phosphofructokinase with tubulin and microtubules. Quantitative evaluation of the mutual effects. *J. Biol. Chem.* 268, 10888–10894.
- Li, L., Wei, D., Wang, Q., Pan, J., Liu, R., Zhang, X., and Bao, L. (2012). MEC-17 deficiency leads to reduced alpha-tubulin acetylation and impaired migration of cortical neurons. *J Neurosci* 32, 12673–12683.
- Li, W., Zhang, B., Tang, J., Cao, Q., Wu, Y., Wu, C., Guo, J., Ling, E.-A., and Liang, F. (2007). Sirtuin 2, a mammalian homolog of yeast silent information regulator-2 longevity regulator, is an oligodendroglial protein that decelerates cell differentiation through deacetylating alpha-tubulin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 2606–2616.

- Li, Y., Zhang, X., Polakiewicz, R.D., Yao, T.-P., and Comb, M.J. (2008). HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization. *J. Biol. Chem.* 283, 12686–12690.
- Lim, S.S., Sammak, P.J., and Borisy, G.G. (1989). Progressive and spatially differentiated stability of microtubules in developing neuronal cells. *J. Cell Biol.* 109, 253–263.
- Liu, X., Xiao, W., Wang, X.-D., Li, Y.-F., Han, J., and Li, Y. (2013). The p38-interacting protein (p38IP) regulates G2/M progression by promoting α -tubulin acetylation via inhibiting ubiquitination-induced degradation of the acetyltransferase GCN5. *J. Biol. Chem.* 288, 36648–36661.
- Lopreiato, R., Giacomello, M., and Carafoli, E. (2014). The Plasma Membrane Calcium Pump: New Ways to Look at an Old Enzyme. *J. Biol. Chem.*
- Lu, Q., and Luduena, R.F. (1993). Removal of beta III isotype enhances taxol induced microtubule assembly. *Cell Struct. Funct.* 18, 173–182.
- Lu, Q., and Luduena, R.F. (1994). In vitro analysis of microtubule assembly of isotypically pure tubulin dimers. Intrinsic differences in the assembly properties of alpha beta II, alpha beta III, and alpha beta IV tubulin dimers in the absence of microtubule-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 2041–2047.
- Lüders, J., and Stearns, T. (2007). Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 161–167.
- Ludueña, R.F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* 178, 207–275.
- Maccioni, R.B., and Cambiazo, V. (1995). Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol. Rev.* 75, 835–864.
- Maruta, H., Greer, K., and Rosenbaum, J.L. (1986). The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J. Cell Biol.* 103, 571–579.
- Matov, A., Applegate, K., Kumar, P., Thoma, C., Krek, W., Danuser, G., and Wittmann, T. (2010). Analysis of microtubule dynamic instability using a plus-end growth marker. *Nat. Methods* 7, 761–768.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., et al. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J* 21, 6820–6831.
- Means, G.E., and Feeney, R.E. (1990). Chemical modifications of proteins: history and applications. *Bioconjug. Chem.* 1, 2–12.
- Mialhe, A., Lafanechère, L., Treilleux, I., Peloux, N., Dumontet, C., Brémond, A., Panh, M.H., Payan, R., Wehland, J., Margolis, R.L., et al. (2001). Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer Res.* 61, 5024–5027.
- Minoura, I., Hachikubo, Y., Yamakita, Y., Takazaki, H., Ayukawa, R., Uchimura, S., and Muto, E. (2013). Overexpression, purification, and functional analysis of recombinant human tubulin dimer. *FEBS Lett.* 587, 3450–3455.
- Monesterolo, N.E., Santander, V.S., Competelli, A.N., Arce, C.A., Barra, H.S., and Casale, C.H.

(2008). Activation of PMCA by calmodulin or ethanol in plasma membrane vesicles from rat brain involves dissociation of the acetylated tubulin/PMCA complex. *FEBS J* 275, 3567–3579.

Moore, C.A., Perderiset, M., Francis, F., Chelly, J., Houdusse, A., and Milligan, R.A. (2004). Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Mol. Cell* 14, 833–839.

Mostowy, S., and Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 183–194.

Mullen, R.J., Eicher, E.M., and Sidman, R.L. (1976). Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 208–212.

Muller-Reichert, T., Chretien, D., Severin, F., and Hyman, A.A. (1998). Structural changes at microtubule ends accompanying GTP hydrolysis: Information from a slowly hydrolyzable analogue of GTP, guanylyl (??)methylenediphosphonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3661–3666.

Nagano, T., and Suzuki, F. (1975). Microtubules with 15 subunits in cockroach epidermal cells. *J. Cell Biol.* 64, 242–245.

Neumann, B., and Hilliard, M.A. (2014). Loss of MEC-17 leads to microtubule instability and axonal degeneration. *Cell Rep.* 6, 93–103.

Nicastro, D., Fu, X., Heuser, T., Tso, A., Porter, M.E., and Linck, R.W. (2011). Cryo-electron tomography reveals conserved features of doublet microtubules in flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E845–853.

Niggli, V., Penniston, J.T., and Carafoli, E. (1979). Purification of the (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J. Biol. Chem.* 254, 9955–9958.

Nishihama, R., Onishi, M., and Pringle, J.R. (2011). New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. *Biol. Chem.* 392, 681–687.

Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., and Downing, K.H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96, 79–88.

North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M., and Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11, 437–444.

O'Brien, E.T., Salmon, E.D., and Erickson, H.P. (1997). How calcium causes microtubule depolymerization. *Cell Motil. Cytoskeleton* 36, 125–135.

Ohkawa, N., Sugisaki, S., Tokunaga, E., Fujitani, K., Hayasaka, T., Setou, M., and Inokuchi, K. (2008). N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes Cells* 13, 1171–1183.

Orosz, F., Santamaría, B., Ovádi, J., and Aragón, J.J. (1999). Phosphofructokinase from *Dictyostelium discoideum* is a potent inhibitor of tubulin polymerization. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 1857–1865.

Ovádi, J., and Orosz, F. (1992). Calmodulin and dynamics of interactions of cytosolic enzymes. *Curr. Top. Cell. Regul.* 33, 105–126.

Ozaki, T., Wu, D., Sugimoto, H., Nagase, H., and Nakagawara, A. (2013). Runt-related transcription

factor 2 (RUNX2) inhibits p53-dependent apoptosis through the collaboration with HDAC6 in response to DNA damage. *Cell Death Dis.* 4, e610.

Palazzo, A., Ackerman, B., and Gundersen, G.G. (2003). Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility. *Nature* 421, 230.

Pampaloni, F., Lattanzi, G., Jonás, A., Surrey, T., Frey, E., and Florin, E.-L. (2006). Thermal fluctuations of grafted microtubules provide evidence of a length-dependent persistence length. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10248–10253.

Pan, F., Malmberg, R.L., and Momany, M. (2007). Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol. Biol.* 7, 103.

Panda, D., Miller, H.P., Banerjee, A., Ludueña, R.F., and Wilson, L. (1994). Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11358–11362.

Pandey, K., and Sharma, S.K. (2011). Activity-dependent acetylation of alpha tubulin in the hippocampus. *J Mol Neurosci* 45, 1–4.

Pandithage, R., Lilischkis, R., Harting, K., Wolf, A., Jedamzik, B., Lüscher-Firzlaff, J., Vervoorts, J., Lasonder, E., Kremmer, E., Knöll, B., et al. (2008). The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility. *J. Cell Biol.* 180, 915–929.

Parmigiani, R.B., Xu, W.S., Venta-Perez, G., Erdjument-Bromage, H., Yaneva, M., Tempst, P., and Marks, P.A. (2008). HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9633–9638.

Paturle-Lafanechère, L., Eddé, B., Denoulet, P., Van Dorsselaer, A., Mazarguil, H., Le Caer, J.P., Wehland, J., and Job, D. (1991). Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry (Mosc.)* 30, 10523–10528.

Paturle-Lafanechère, L., Manier, M., Trigault, N., Pirollet, F., Mazarguil, H., and Job, D. (1994). Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 6), 1529–1543.

Perez, M., Santa-Maria, I., Gomez de Barreda, E., Zhu, X., Cuadros, R., Cabrero, J.R., Sanchez-Madrid, F., Dawson, H.N., Vitek, M.P., Perry, G., et al. (2009). Tau--an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *J. Neurochem.* 109, 1756–1766.

Peris, L., Thery, M., Fauré, J., Saoudi, Y., Lafanechère, L., Chilton, J.K., Gordon-Weeks, P., Galjart, N., Bornens, M., Wordeman, L., et al. (2006). Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* 174, 839–849.

Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechère, L., Brocard, J., Moore, A.T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L., and Andrieux, A. (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J. Cell Biol.* 185, 1159–1166.

Pierson, G.B., Burton, P.R., and Himes, R.H. (1978). Alterations in number of protofilaments in microtubules assembled in vitro. *J. Cell Biol.* 76, 223–228.

Piperno, G., and Fuller, M.T. (1985). Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J Cell Biol* 101, 2085–2094.

Piperno, G., LeDizet, M., and Chang, X.J. (1987). Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J. Cell Biol.* 104, 289–302.

Prota, A.E., Magiera, M.M., Kuijpers, M., Bargsten, K., Frey, D., Wieser, M., Jaussi, R., Hoogenraad, C.C., Kammerer, R.A., Janke, C., et al. (2013). Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *J. Cell Biol.* 200, 259–270.

Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., Henske, E.P., and Golemis, E.A. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* 129, 1351–1363.

Quinlan, R.A., Brenner, M., Goldman, J.E., and Messing, A. (2007). GFAP and its role in Alexander disease. *Exp. Cell Res.* 313, 2077–2087.

Raybin, D., and Flavin, M. (1977). Enzyme which specifically adds tyrosine to the alpha chain of tubulin. *Biochemistry (Mosc.)* 16, 2189–2194.

Redeker, V., Le Caer, J.P., Rossier, J., and Promé, J.C. (1991). Structure of the polyglutamyl side chain posttranslationally added to alpha-tubulin. *J. Biol. Chem.* 266, 23461–23466.

Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., and Verhey, K.J. (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16, 2166–2172.

Regnard, C., Audebert, S., Desbruyères, Denoulet, P., and Eddé, B. (1998). Tubulin polyglutamylase: partial purification and enzymatic properties. *Biochemistry (Mosc.)* 37, 8395–8404.

Riolo, M.T., Cooper, Z.A., Holloway, M.P., Cheng, Y., Bianchi, C., Yakirevich, E., Ma, L., Chin, Y.E., and Altura, R.A. (2012). Histone deacetylase 6 (HDAC6) deacetylates survivin for its nuclear export in breast cancer. *J. Biol. Chem.* 287, 10885–10893.

Rodríguez, J.A., Arce, C.A., Barra, H.S., and Caputto, R. (1973). Release of tyrosine incorporated as a single unit into rat brain protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54, 335–340.

Rodríguez de la Vega, M., Sevilla, R.G., Hermoso, A., Lorenzo, J., Tanco, S., Diez, A., Fricker, L.D., Bautista, J.M., and Avilés, F.X. (2007). Nna1-like proteins are active metalloproteases of a new and diverse M14 subfamily. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 851–865.

Rogowski, K., van Dijk, J., Magiera, M.M., Bosc, C., Deloulme, J.-C., Bosson, A., Peris, L., Gold, N.D., Lacroix, B., Bosch Grau, M., et al. (2010). A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* 143, 564–578.

Roll-Mecak, A., and McNally, F.J. (2010). Microtubule-severing enzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 96–103.

Roll-Mecak, A., and Vale, R.D. (2008). Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature* 451, 363–367.

Ronner, P., Gazzotti, P., and Carafoli, E. (1977). A lipid requirement for the (Ca²⁺ + Mg²⁺)-activated ATPase of erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 578–583.

Sale, W.S., Besharse, J.C., and Piperno, G. (1988). Distribution of acetylated alpha-tubulin in retina and in vitro-assembled microtubules. *Cell Motil. Cytoskeleton* 9, 243–253.

Santander, V.S., Bisig, C.G., Purro, S.A., Casale, C.H., Arce, C.A., and Barra, H.S. (2006). Tubulin

must be acetylated in order to form a complex with membrane Na(+),K (+)-ATPase and to inhibit its enzyme activity. *Mol Cell Biochem* 291, 167–174.

Santarella, R.A., Skiniotis, G., Goldie, K.N., Tittmann, P., Gross, H., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., and Hoenger, A. (2004). Surface-decoration of microtubules by human tau. *J. Mol. Biol.* 339, 539–553.

Sauer, G., Körner, R., Hanisch, A., Ries, A., Nigg, E.A., and Silljé, H.H.W. (2005). Proteome analysis of the human mitotic spindle. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 4, 35–43.

Saxton, W.M., and Hollenbeck, P.J. (2012). The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* 125, 2095–2104.

Schatten, G., Simerly, C., Asai, D.J., Szöke, E., Cooke, P., and Schatten, H. (1988). Acetylated alpha-tubulin in microtubules during mouse fertilization and early development. *Dev. Biol.* 130, 74–86.

Schulze, E., Asai, D.J., Bulinski, J.C., and Kirschner, M. (1987). Posttranslational modification and microtubule stability. *J. Cell Biol.* 105, 2167–2177.

Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemercier, C., Garin, J., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2001). Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8035–8044.

Sepúlveda, M.R., and Mata, A.M. (2004). The interaction of ethanol with reconstituted synaptosomal plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1665, 75–80.

Shah, C., Xu, C.Z., Vickers, J., and Williams, R. (2001). Properties of microtubules assembled from mammalian tubulin synthesized in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 4844–4852.

Sharma, N., Bryant, J., Wloga, D., Donaldson, R., Davis, R.C., Jerka-Dziadosz, M., and Gaertig, J. (2007). Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia. *J. Cell Biol.* 178, 1065–1079.

Sharp, D.J., and Ross, J.L. (2012). Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J. Cell Sci.* 125, 2561–2569.

Shelanski, M.L., Gaskin, F., and Cantor, C.R. (1973). Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 765–768.

Shida, T., Cueva, J.G., Xu, Z., Goodman, M.B., and Nachury, M.V. (2010). The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc Natl Acad Sci U A* 107, 21517–21522.

Sirajuddin, M., Rice, L.M., and Vale, R.D. (2014). Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. *Nat. Cell Biol.* advance online publication.

Skoufias, D.A., and Wilson, L. (1998). Assembly and colchicine binding characteristics of tubulin with maximally tyrosinated and detyrosinated alpha-tubulins. *Arch. Biochem. Biophys.* 351, 115–122.

Sloboda, R.D., and Belfi, L.M. (1998). Purification of tubulin and microtubule-associated proteins by membrane ion-exchange chromatography. *Protein Expr. Purif.* 13, 205–209.

Smallwood, J.I., Gügi, B., and Rasmussen, H. (1988). Regulation of erythrocyte Ca²⁺ pump activity

by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 263, 2195–2202.

Solinger, J.A., Paolinelli, R., Klöss, H., Scorza, F.B., Marchesi, S., Sauder, U., Mitsushima, D., Capuani, F., Stürzenbaum, S.R., and Cassata, G. (2010). The *Caenorhabditis elegans* Elongator complex regulates neuronal alpha-tubulin acetylation. *PLoS Genet.* 6, e1000820.

Soppina, V., Herbstman, J.F., Skiniotis, G., and Verhey, K.J. (2012). Luminal Localization of α -tubulin K40 Acetylation by Cryo-EM Analysis of Fab-Labeled Microtubules. *PLoS ONE* 7, e48204.

Soucek, K., Kamaid, A., Phung, A.D., Kubala, L., Bulinski, J.C., Harper, R.W., and Eiserich, J.P. (2006). Normal and prostate cancer cells display distinct molecular profiles of alpha-tubulin posttranslational modifications. *The Prostate* 66, 954–965.

Southwood, C.M., Peppi, M., Dryden, S., Tainsky, M.A., and Gow, A. (2007). Microtubule deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the nervous system. *Neurochem. Res.* 32, 187–195.

Strehler, E.E., Filoteo, A.G., Penniston, J.T., and Caride, A.J. (2007). Plasma-membrane Ca(2+) pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 919–922.

Subramanian, C., Jarzembowski, J.A., Opiari, A.W., Jr, Castle, V.P., and Kwok, R.P.S. (2011). HDAC6 deacetylates Ku70 and regulates Ku70-Bax binding in neuroblastoma. *Neoplasia N. Y.* N 13, 726–734.

Sudo, H., and Baas, P.W. (2010). Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 7215–7226.

Sullivan, K.F., and Cleveland, D.W. (1986). Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4327–4331.

Szyk, A., Deaconescu, A.M., Piszczek, G., and Roll-Mecak, A. (2011). Tubulin tyrosine ligase structure reveals adaptation of an ancient fold to bind and modify tubulin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1250–1258.

Taes, I., Timmers, M., Hersmus, N., Bento-Abreu, A., Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Auwerx, J., and Robberecht, W. (2013). Hdac6 deletion delays disease progression in the SOD1G93A mouse model of ALS. *Hum. Mol. Genet.* 22, 1783–1790.

Taschner, M., Vetter, M., and Lorentzen, E. (2012). Atomic resolution structure of human α -tubulin acetyltransferase bound to acetyl-CoA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 19649–19654.

Teixidó-Travesa, N., Roig, J., and Lüders, J. (2012). The where, when and how of microtubule nucleation - one ring to rule them all. *J. Cell Sci.* 125, 4445–4456.

Tischfield, M.A., Cederquist, G.Y., Gupta, M.L., Jr, and Engle, E.C. (2011). Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 286–294.

Tokési, N., Lehotzky, A., Horváth, I., Szabó, B., Oláh, J., Lau, P., and Ovádi, J. (2010). TPPP/p25 promotes tubulin acetylation by inhibiting histone deacetylase 6. *J. Biol. Chem.* 285, 17896–17906.

Topalidou, I., Keller, C., Kalebic, N., Nguyen, K.C., Somhegyi, H., Politi, K.A., Heppenstall, P., Hall,

- D.H., and Chalfie, M. (2012). Genetically separable functions of the MEC-17 tubulin acetyltransferase affect microtubule organization. *Curr Biol* 22, 1057–1065.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U A* 76, 4350–4354.
- Tran, A.D., Marmo, T.P., Salam, A.A., Che, S., Finkelstein, E., Kabarriti, R., Xenias, H.S., Mazitschek, R., Hubbert, C., Kawaguchi, Y., et al. (2007). HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J Cell Sci* 120, 1469–1479.
- Valenzuela, P., Quiroga, M., Zaldivar, J., Rutter, W.J., Kirschner, M.W., and Cleveland, D.W. (1981). Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by alpha and beta tubulin mRNAs. *Nature* 289, 650–655.
- Vanagas, L., de La Fuente, M.C., Dalghi, M., Ferreira-Gomes, M., Rossi, R.C., Strehler, E.E., Mangialavori, I.C., and Rossi, J.P.F.C. (2013). Differential effects of G- and F-actin on the plasma membrane calcium pump activity. *Cell Biochem. Biophys.* 66, 187–198.
- Vasquez, R.J., Gard, D.L., and Cassimeris, L. (1994). XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *J. Cell Biol.* 127, 985–993.
- Verdel, A., and Khochbin, S. (1999). Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J. Biol. Chem.* 274, 2440–2445.
- Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M.P., Rousseaux, S., Lemerrier, C., Yoshida, M., and Khochbin, S. (2000). Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr. Biol.* CB 10, 747–749.
- Verdin, E., Dequiedt, F., and Kasler, H.G. (2003). Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 19, 286–293.
- Verhey, K.J., Kaul, N., and Soppina, V. (2011). Kinesin assembly and movement in cells. *Annu. Rev. Biophys.* 40, 267–288.
- Vértessy, B.G., Orosz, F., Kovács, J., and Ovádi, J. (1997). Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules. Molecular studies in the phosphofructokinase/aldolase/microtubule system. *J. Biol. Chem.* 272, 25542–25546.
- Vértessy, B.G., Bánkfalvi, D., Kovács, J., Löw, P., Lehotzky, A., and Ovádi, J. (1999). Pyruvate kinase as a microtubule destabilizing factor in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 430–435.
- Vladimirova, N.M., Potapenko, N.A., and Modianov, N.N. (1995). [Structural analysis of isoforms of Na⁺,K⁺-ATPase from calf brain]. *Bioorg. Khim.* 21, 483–491.
- Vladimirova, N.M., Sautkina, E.N., Ovchinnikova, T.V., and Potapenko, N.A. (2002). Interaction between tubulin and Na⁺,K⁺-ATPase in brain stem neurons. *Biochem. Biokhimiia* 67, 503–509.
- Vogel, P., Hansen, G., Fontenot, G., and Read, R. (2010). Tubulin tyrosine ligase-like 1 deficiency results in chronic rhinosinusitis and abnormal development of spermatid flagella in mice. *Vet. Pathol.* 47, 703–712.
- Vorherr, T., Kessler, T., Hofmann, F., and Carafoli, E. (1991). The calmodulin-binding domain

mediates the self-association of the plasma membrane Ca²⁺ pump. *J. Biol. Chem.* 266, 22–27.

Wágner, G., Kovács, J., Löw, P., Orosz, F., and Ovádi, J. (2001). Tubulin and microtubule are potential targets for brain hexokinase binding. *FEBS Lett.* 509, 81–84.

Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P., and Salmon, E.D. (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.* 107, 1437–1448.

Walter, W.J., Beranek, V., Fischermeier, E., and Diez, S. (2012). Tubulin acetylation alone does not affect Kinesin-1 velocity and run length in vitro. *PLoS One* 7, e42218.

Wang, H.-W., and Nogales, E. (2005). Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature* 435, 911–915.

Wang, L., and Brown, A. (2002). Rapid movement of microtubules in axons. *Curr. Biol. CB* 12, 1496–1501.

Wang, B., Rao, Y.-H., Inoue, M., Hao, R., Lai, C.-H., Chen, D., McDonald, S.L., Choi, M.-C., Wang, Q., Shinohara, M.L., et al. (2014). Microtubule acetylation amplifies p38 kinase signalling and anti-inflammatory IL-10 production. *Nat. Commun.* 5, 3479.

Wang, K.K., Wright, L.C., Machan, C.L., Allen, B.G., Conigrave, A.D., and Roufogalis, B.D. (1991). Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 266, 9078–9085.

Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., and McPhail, A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325–2327.

Webster, D.R., and Borisy, G.G. (1989). Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J. Cell Sci.* 92 (Pt 1), 57–65.

Webster, B.R., Scott, I., Traba, J., Han, K., and Sack, M.N. (2014). Regulation of autophagy and mitophagy by nutrient availability and acetylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 525–534.

Webster, D.R., Wehland, J., Weber, K., and Borisy, G.G. (1990). Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo. *J. Cell Biol.* 111, 113–122.

Weisenberg, R.C. (1972). Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* 177, 1104–1105.

Weisenberg, R.C., Deery, W.J., and Dickinson, P.J. (1976). Tubulin-nucleotide interactions during the polymerization and depolymerization of microtubules. *Biochemistry (Mosc.)* 15, 4248–4254.

Westendorf, J.J., Zaidi, S.K., Cascino, J.E., Kahler, R., van Wijnen, A.J., Lian, J.B., Yoshida, M., Stein, G.S., and Li, X. (2002). Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7982–7992.

Wickström, S.A., Masoumi, K.C., Khochbin, S., Fässler, R., and Massoumi, R. (2010). CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin. *EMBO J.* 29, 131–144.

Widlund, P.O., Podolski, M., Reber, S., Alper, J., Storch, M., Hyman, A.A., Howard, J., and Drechsel, U. (2004). The microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is a novel substrate for the histone deacetylase HDAC6. *J. Biol. Chem.* 279, 10757–10764.

- D.N. (2012). One-step purification of assembly-competent tubulin from diverse eukaryotic sources. *Mol. Biol. Cell* 23, 4393–4401.
- Wilson, P.J., and Forer, A. (1989). Acetylated α -tubulin in spermatogenic cells of the crane fly *Nephrotoma suturalis*: Kinetochore microtubules are selectively acetylated. *Cell Motil. Cytoskeleton* 14, 237–250.
- Wloga, D., and Gaertig, J. (2010). Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell Sci.* 123, 3447–3455.
- Wolf, N., Regan, C.L., and Fuller, M.T. (1988). Temporal and spatial pattern of differences in microtubule behaviour during *Drosophila* embryogenesis revealed by distribution of a tubulin isoform. *Dev. Camb. Engl.* 102, 311–324.
- Wolff, J. (2009). Plasma membrane tubulin. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1415–1433.
- Wolff, A., de Néchaud, B., Chillet, D., Mazarguil, H., Desbruyères, E., Audebert, S., Eddé, B., Gros, F., and Denoulet, P. (1992). Distribution of glutamylated alpha and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur. J. Cell Biol.* 59, 425–432.
- Worman, H.J., Fong, L.G., Muchir, A., and Young, S.G. (2009). Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy. *J. Clin. Invest.* 119, 1825–1836.
- Xiong, X., Xu, D., Yang, Z., Huang, H., and Cui, X. (2013). A single amino-acid substitution at lysine 40 of an *Arabidopsis thaliana* α -tubulin causes extensive cell proliferation and expansion defects. *J. Integr. Plant Biol.* 55, 209–220.
- Yang, W., Guo, X., Thein, S., Xu, F., Sugii, S., Baas, P.W., Radda, G.K., and Han, W. (2013). Regulation of adipogenesis by cytoskeleton remodelling is facilitated by acetyltransferase MEC-17-dependent acetylation of α -tubulin. *Biochem. J.* 449, 605–612.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., and Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265, 17174–17179.
- Zampar, G.G., Chesta, M.E., Carbajal, A., Chanaday, N.L., Diaz, N.M., Casale, C.H., and Arce, C.A. (2009). Acetylated tubulin associates with the fifth cytoplasmic domain of Na(+)/K(+)-ATPase: possible anchorage site of microtubules to the plasma membrane. *Biochem J* 422, 129–137.
- Zhang, W., and Kone, B.C. (2002). NF- κ B inhibits transcription of the H(+)-K(+)-ATPase alpha(2)-subunit gene: role of histone deacetylases. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283, F904–911.
- Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J.T., Yang, X.-J., Dent, S.R., et al. (2007). HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol. Cell* 27, 197–213.
- Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., and Matthias, P. (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J* 22, 1168–1179.
- Zhang, Y., Kwon, S., Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Rousseaux, S., Kneissel, M., Cao, C., Li, N., Cheng, H.-L., Chua, K., et al. (2008). Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1688–1701.
- Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., et al. (2010a).

Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation. *Science* 327, 1000–1004.

Zhao, Z., Xu, H., and Gong, W. (2010b). Histone deacetylase 6 (HDAC6) is an independent deacetylase for alpha-tubulin. *Protein Pept. Lett.* 17, 555–558.

Zhu, J., Coyne, C.B., and Sarkar, S.N. (2011). PKC alpha regulates Sendai virus-mediated interferon induction through HDAC6 and β -catenin. *EMBO J.* 30, 4838–4849.

Zilberman, Y., Ballestrem, C., Carramusa, L., Mazitschek, R., Khochbin, S., and Bershadsky, A. (2009). Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J. Cell Sci.* 122, 3531–3541.



R-T

574.19245

C

13823



13823